# VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG EXTREMER TEMPERATUREN AUF BIOMEMBRANEN VON BLATTZELLEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Regina Thebud-Lassak

aus Düsseldorf

Düsseldorf 1983

UNIV.
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0045

# VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG EXTREMER TEMPERATUREN AUF BIOMEMBRANEN VON BLATTZELLEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Regina Thebud-Lassak

aus Düsseldorf

Düsseldorf 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K.A. Santarius
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Strotmann
Tag der mündlichen Prüfung: 04. November 1983

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


Seite

Verzeichnis der Abkürzungen.....1

1. Einleitung.....2

2. Material und Methoden.....7

2.1. Pflanzenmaterial.....7

2.2. Temperaturbehandlung ganzer Blätter.....7

2.2.1. Gefrieren.....7

2.2.2. Hitze.....7

2.3. Isolierungen.....8

2.3.1. Isolierung von Mitochondrien und Thylakoiden.8

2.3.2. Isolierung von Protoplasten.....9

2.4. Temperaturbehandlung isolierter Mitochondrien, Thylakoide und Protoplasten.....10

2.4.1. Gefrieren.....10

2.4.2. Hitze.....10

2.5. Chlorophyll- und Proteinbestimmungen.....11

2.6. Messung der Photosynthese- und Atmungsaktivität....11

2.6.1. Photosynthese und Atmung ganzer Blätter.....11

2.6.2. Polarographische Sauerstoffmessungen.....12

2.6.2.1. Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien.....12

2.6.2.2. Photosynthetische Reaktionen isolierter Thylakoide.....12

2.6.2.3. Photosynthese und Atmung isolierter Protoplasten.....13

2.6.3. Spektralphotometrische Messung des Elektronentransports isolierter Thylakoide.....13

2.6.4. Enzymatische ATP-Bestimmung mit der firefly-Methode.....14

2.7. Charakterisierung der Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma an isolierten Protoplasten.....15

2.7.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der Permeabilität für Neutralrot und Evan's Blau.....15

2.7.2. Messung des Ioneneffluxes.....16

Seite

3. Ergebnisse.....17
3.1. Gefrieren.....17
3.1.1. Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach Gefrieren in vitro.....17
3.1.2. Versuche zur Simulation des Gefrierschadens durch Einwirkung hoher Elektrolytkonzentrationen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts.....31
3.1.3. Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach Gefrieren in situ.....38
3.2. Hitze.....42
3.2.1. Photosynthese und Atmung hitzebehandelter Blätter und isolierter Protoplasten.....42
3.2.2. Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach Hitzebehandlung in situ und in vitro..46
3.2.3. Hitzeeinwirkung auf Tonoplast und Plasmalemma isolierter Protoplasten.....51
4. Diskussion.....58
4.1. Gefrieren.....58
4.1.1. Gefrieren isolierter Mitochondrien und Thylakoide.....58
4.1.2. Gefrieren ganzer Blätter.....65
4.2. Hitze.....68
4.2.1. Atmung.....68
4.2.2. Photosynthese.....72
4.2.3. Kompartimentierung.....75
4.2.4. Mögliche Ursachen irreversiblen Hitzeschadens bei Pflanzen.....78
4.3. Vergleich der Wirkung von Gefrieren und Hitze.....80
5. Zusammenfassung.....83
6. Literaturverzeichnis.....86

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

BSA.....Rinderserumalbumin
Chl.....Chlorophyll
DCPIP.....2,6-Dichlorphenolindophenol
DNP.....2,4-Dinitrophenol
EDTA.....Äthylendiamintetraessigsäure
ET.....Elektronentransport
FeCN.....Ferricyanid (Kaliumhexacyanoferrat III)
HEPES.....N-2-Hydroxyäthyl-piperazinyl-N'-2-Äthansulfonsäure
h.....Stunde
l.....Liter
MES.....2-N-Morpholino-Äthansulfonsäure
MG.....Molekulargewicht
MOPS.....2-N-Morpholino-Propansulfonsäure
MV.....Methylviologen
NCPP.....Nichtzyklische Photophosphorylierung
PC.....photosynthetische Kontrolle
PS I.....Photosystem I
PS II..... " II
PVP.....Polyvinylpyrrolidon
RC.....respiratorische Kontrolle
Ref.....Referenz(en)
TRA.....Triäthanolamin-hydrochlorid
TRICIN.....N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin
Tris.....Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U.....Unit (Enzymeinheit)

## 1. EINLEITUNG

Die meisten Pflanzen werden durch Einwirkung extrem hoher bzw. niedriger Temperaturen abgetötet. Zwar kann durch eine vorausgehende Härtungsperiode eine zum Teil beträchtliche Frost- und Hitzeresistenz erworben werden (siehe Levitt, 1980; Steponkus, 1981); dennoch ist der Temperaturbereich, in dem die Pflanzen Hitze und Gefrieren überleben können, limitiert.

Älteren Ansichten zufolge ist die Schädigung der Zelle durch Einwirkung extremer Temperaturen auf eine Denaturierung von Protoplasmaproteinen zurückzuführen (Alexandrov, 1977; weitere Ref. bei Levitt, 1980 und Steponkus, 1981). Die meisten löslichen Enzyme erwiesen sich jedoch als relativ stabil gegenüber Hitze und Frost (Ref. in Björkman et al., 1980; Levitt, 1980). Mittlerweile gilt als gesichert, daß Biomembranen besonders temperaturempfindliche Orte in der Pflanzenzelle darstellen (Heber und Santarius, 1964; Santarius, 1973; 1975; Garber und Steponkus, 1976; Wiest und Steponkus, 1978; weitere Ref. in Levitt, 1980). Dies schließt nicht aus, daß verschiedene zelluläre Membranen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber extremen Temperaturen besitzen. So muß z.B. diejenige Membran, die sich als die hitzelabilste erweist, nicht notwendigerweise auch den primären Ort des Gefrierschadens darstellen.

Wie wirken Frost und Hitze auf die Pflanze?

Beim langsamen Gefrieren pflanzlicher Gewebe unter natürlichen Bedingungen führt die Eisbildung in den Interzellularen zu einer Dehydratation der Zelle. Die daraus resultierende Konzentrierung gelöster Zellinhaltsstoffe, von denen einige nach Überschreiten physiologischer Konzentrationen schädigend wirken, wird als eine Ursache der Membraninaktivierung angesehen (Heber und Santarius, 1973; 1976; Heber et al., 1979; 1981). Ferner verursacht die extrazelluläre Eisbildung eine mechanische Beanspruchung der Biomembranen. Sie kommt dadurch zustan-

de, daß eine Kontraktion des Protoplasten bzw. seiner Oberfläche beim Wasserverlust während des Frierens und eine Reexpansion im Verlauf des Wassereinstroms während des Tauens eintritt. Dabei halten einige Autoren die Reduktion des Zellvolumens (Meryman, 1970; Meryman et al., 1977; Williams und Shaw, 1980), andere die mit Verlust an Membranmaterial (Singh, 1979) verbundene Verkleinerung der Membranoberfläche, welche sich nach dem Tauen nicht mehr auf ihre ursprüngliche Größe ausdehnen kann (Wiest und Steponkus, 1978; Williams und Hope, 1981; Williams et al., 1981), für die primäre Ursache des Gefrierschadens.

Die Tatsache, daß in gefrorenen und aufgetauten Spinatblättern nicht nur der photosynthetische und respiratorische $CO_2$-Austausch des Gewebes, sondern auch die ATP-Spiegel im Licht und im Dunkeln bei denselben Temperaturen zusammenbrechen (Klosson und Krause, 1981; Krause et al., 1982; Krause und Klosson, 1983), legt die Vermutung nahe, daß die Gefrierinaktivierung der Photosynthese und Atmung in Blättern auf eine Schädigung der energiekonservierenden Membranen zurückzuführen sein könnte.

Eine Inaktivierung von Mitochondrien und Thylakoiden nach Gefrieren in situ konnte mehrfach beobachtet werden (Gazeau, 1974; weitere Ref. in Bauer et al., 1975; Levitt, 1980); die Ergebnisse sind jedoch teilweise widersprüchlich. Während man nach Anderson und Mc Daniel (1978) aus gefrorenem und nicht mehr lebensfähigem Pflanzenmaterial Mitochondrien mit verschlechterter oder gar völlig aufgehobener Atmungsaktivität erhält, sind Singh et al. (1977) und Singh (1979) zufolge die Mitochondrien noch intakt, wenn die Pflanzen durch extrazelluläres Frieren bereits abgetötet worden sind. Aus frostgeschädigten Blättern isolierte Thylakoide weisen eine Hemmung des Elektronentransports auf (Heber et al., 1973), welche nahezu simultan mit der Inaktivierung der Photophosphorylierung und der Senkung der Rate der lichtinduzierten Protonenaufnahme erfolgt (Klosson und Krause, 1981; Krause et al., 1982). Eine lediglich partielle Erniedrigung des Protonengradienten tritt erst nach stärkerer Frost-

einwirkung ein. Dies weist darauf hin, daß Gefrieren in situ nicht zu einer Erhöhung der Protonenpermeabilität der photosynthetischen Membran führt (Klosson und Krause, 1981; Krause et al., 1982).

Friert man dagegen Thylakoide in vitro, so weisen diese ein anderes Inaktivierungsmuster auf. Es tritt eine Beschleunigung des Elektronentransports ein, welche auf dessen irreversible Entkopplung von der Photophosphorylierung zurückzuführen ist (Heber und Santarius, 1964). Die Entkopplung kommt durch einen erhöhten Protonenleckfluß aus den Thylakoiden zustande (Heber, 1967; Garber und Steponkus, 1976); es kann kein $H^+$-Gradient mehr gebildet werden, der nach Mitchell (1966) die treibende Kraft der ATP-Synthese darstellt. Im Gegensatz dazu resultiert eine Frosteinwirkung auf isolierte Mitochondrien in einer partiellen Hemmung des Elektronentransports und der oxidativen Phosphorylierung, wobei sich letztere als etwas empfindlicher erwies (Dickinson et al., 1967; Thebud und Santarius, 1981).
Vergleichende Untersuchungen zur Gefrierinaktivierung in situ bzw. in vitro von Thylakoiden und Mitochondrien, die aus demselben Blattmaterial isoliert worden sind, wurden bisher noch nicht durchgeführt. Sie könnten zu einer Klärung der bisher festgestellten Diskrepanzen beitragen.

Auch beim Erhitzen von Blättern bzw. isolierten Thylakoiden und Mitochondrien kommt es zu einer Schädigung dieser Membransysteme. Im grünen Gewebe ist die Photosynthese hitzeempfindlicher als die Dunkelatmung (Langridge und McWilliam, 1967; Bauer, 1972; Larcher, 1973; Alexandrov, 1977; Levitt, 1980). Die höhere Thermosensitivität der Photosynthese manifestiert sich in einer Schädigung der Thylakoide nach Einwirkung überoptimaler Temperaturen in situ und in vitro. Die Wasserspaltungsreaktion im Photosystem II, die Photophosphorylierung und das lichtinduzierte Membranpotential erwiesen sich als besonders hitzeempfindlich (Santarius, 1975; 1980; Berry und Björkman, 1980; Weis, 1982b). Die Tatsache, daß aus hitzegehärteten Pflanzen isolierte Mitochondrien auch in vitro weniger thermo-

labil sind (Andreeva, 1969), ist ein Hinweis darauf, daß auch diesen Organellen eine Bedeutung für die Hitzestabilität der Pflanzen zukommen könnte. Die geringere Hitzeempfindlichkeit des Gaswechsels im Dunkeln sagt nämlich nichts darüber aus, ob parallel zum Sauerstoff-Verbrauch noch eine äquivalente ATP-Synthese stattfinden kann, d.h. ob die energetische Kopplung erhalten bleibt. Bisher liegen nur wenige Daten über die Thermostabilität von Mitochondrien in vivo vor. Während nach Nikulina (1969) die energetische Kopplung in hitzebehandelten Blättern stabil bleibt, kann sie Sagatov et al. (1980) zufolge in Abhängigkeit von den Hitzebedingungen ansteigen, keine Veränderung erfahren oder absinken. Unmittelbare Untersuchungen an aus hitzebehandelten Blättern isolierten Mitochondrien sind noch nicht durchgeführt worden. Es ist denkbar, daß ihre energiekonservierenden Reaktionen nach Hitzeeinwirkung in situ nur wenig stabiler sind als die der Thylakoide, zumal isolierte Mitochondrien durch milde Hitzebehandlung in vitro inaktiviert werden (Kurkova und Andreeva, 1966; Semichatova et al., 1967; Dizengremel und Chauveau, 1978). Ein Vergleich der Hitzeempfindlichkeit von Mitochondrien und Thylakoiden ist anhand der bisher vorliegenden Daten schwierig, da die Untersuchungen an verschiedenem Pflanzenmaterial und unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt worden sind.

Es gibt Hinweise darauf, daß auch andere Membranen der Pflanzenzelle wie z.B. das Plasmalemma durch Einwirkung höherer Temperaturen geschädigt werden können (Gimmler et al., 1978; Nezgovorov, 1978). Ebenso könnte ein hitzeinduzierter Permeabilitätsanstieg des Tonoplasten Veränderungen im Zellmilieu hervorrufen, so daß eine Hitzeinaktivierung energiekonservierender Prozesse letztlich auf den Verlust der Zellkompartimentierung zurückzuführen wäre.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine detaillierte Untersuchung der Auswirkungen extremer Temperaturen auf verschiedene Biomembranen der Pflanzenzelle mit der Absicht, nähere Informationen über den Mechanismus des Frost- und Hitzeschadens zu erhalten. Um zu klären, ob der Zusammenbruch von Photosynthese und Atmung mit einer Inaktivierung der Thylakoide und Mitochondrien korreliert ist, wurde eine Methode zur simultanen Isolierung dieser beiden Biomembransysteme in einem einzigen Präparationsgang aus temperaturbehandeltem bzw. ungeschädigtem Blattmaterial derselben Herkunft entwickelt. Als Meßparameter für die Aktivität der energiekonservierenden Membranen wurden Elektronentransport, Phosphorylierung, respiratorische bzw. photosynthetische Kontrolle sowie das ADP/O-Verhältnis herangezogen. Die Untersuchungen zur Inaktivierung von Thylakoiden und Mitochondrien nach Gefrieren bzw. Erhitzen in situ wurden durch Messungen an isolierten Membransystemen, welche einer Temperaturbehandlung in vitro unterzogen worden waren, ergänzt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Aktivität von Thylakoiden und Mitochondrien nach einer Frostbehandlung in situ bzw. in vitro untersucht. Zur Klärung der Frage, ob die Konzentrationserhöhung potentiell membrantoxischer Substanzen in der ungefrorenen Restlösung die primäre Ursache der Gefrierinaktivierung darstellt, wurden diese Membransysteme zusätzlich hohen Salzkonzentrationen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts ausgesetzt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Empfindlichkeit der Atmungs- und Photosyntheseprozesse in Blättern, Protoplasten und isolierten Membransystemen gegenüber überoptimalen Temperaturen verglichen. Um zu klären, ob die hitzeinduzierte Beeinträchtigung von Atmung und Photosynthese mit einem Semipermeabilitätsverlust von Tonoplast und Plasmalemma korreliert ist, wurden an isolierten Protoplasten Untersuchungen zum Ausschluß und zur Akkumulation von Farbstoffen sowie Messungen des Ioneneffluxes durchgeführt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Pflanzenmaterial

Als Versuchsmaterial dienten Blätter von 4-6 Wochen altem Spinat (Spinacia oleracea L.) sowie von 4 Wochen altem Feldsalat (Valerianella locusta (L.) Betcke). Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei Temperaturen zwischen 13 und 20°C entweder unter einer künstlichen Photoperiode von i.a. 10 h Licht / 14 h Dunkel oder unter natürlichen Lichtbedingungen angezogen.

### 2.2. Temperaturbehandlung ganzer Blätter

#### 2.2.1. Gefrieren

Die Gefrierbehandlung intakter Spinatblätter erfolgte wie bei Klosson und Krause (1981) angegeben. Die Blätter wurden in einem Kryostaten von der Ausgangstemperatur +5°C auf Minimumtemperaturen zwischen -5 und -9°C abgekühlt und anschließend wieder auf +5°C erwärmt. Das Gefrieren und Auftauen erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 6°C/h. Die Verweildauer bei der jeweiligen Minimumtemperatur betrug 2 h. Blätter, die über den gesamten Zeitraum bei +4°C aufbewahrt wurden, dienten als Kontrollen.

#### 2.2.2. Hitze

Intakte Spinatblätter wurden 6 min lang in einem Wasserbad bei Temperaturen zwischen 36 und 45°C inkubiert und wie folgt weiterbehandelt: a) Nach einer mindestens 90 minütigen Erholung (Weis, 1981a) bei Zimmertemperatur (20-24°C) wurden Messungen des $CO_2$-Austauschs an intakten Blättern vorgenommen (2.6.1.). b) Die erhitzten Blätter wurden ca. 15 min bei Zimmertemperatur aufbewahrt und, ebenso wie die Kontrollen, 10 min bei +4°C vor-

gekühlt, bevor Mitochondrien und Thylakoide isoliert wurden (2.3.1.). Blätter, die über den gesamten Zeitraum bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, dienten als Kontrollen.

## 2.3. Isolierungen

### 2.3.1. Isolierung von Mitochondrien und Thylakoiden

Mitochondrien und Thylakoide wurden in einem einzigen Präparationsgang aus demselben Spinatblattmaterial isoliert. Frisch geerntete bzw. nach 2.2. behandelte Blätter wurden 3 sec im Waring Blender in einem Medium isoliert, das aus 300 mM Mannit, 20 mM HEPES-NaOH, 20 mM MOPS, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $KH_2PO_4$, 1mM EDTA, 4 mM Cystein, 0,6 % unlöslichem PVP, 0,4 % BSA, pH 7,3 bestand (pro 100 g Blätter 400 ml Medium). Das Homogenat wurde durch 8 Lagen Mull gepreßt und das Filtrat 90 sec bei 1600 g zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden aus dem Überstand vergleichbar zu Douce et al. (1977) isoliert und anschließend im Waschmedium resuspendiert, das aus 15 mM HEPES-NaOH, 15 mM MOPS, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $KH_2PO_4$, 1 mM EDTA und 0,4 % BSA (pH 7,2) bestand und als Osmotikum entweder 200 mM NaCl (für eine anschließende Gefrierbehandlung in vitro bzw. erhöhte Ionenbelastung bei $0^{\circ}C$ (2.4.1.)) oder 300 mM Mannit (bei Isolation der Membranen aus temperaturbehandelten Blättern (2.2.) bzw. für eine anschließende Hitzebehandlung in vitro (2.4.2.)) enthielt. Das Sediment der ersten Zentrifugation, welches die Chloroplasten enthielt, wurde auf verschiedene Weise weiterbehandelt (A,B).

A

Das Sediment wurde in einem hypotonischen Medium aus 20 mM HEPES-NaOH, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl und 5 mM $KH_2PO_4$ (pH 7,0) resuspendiert, wobei die Thylakoide freigesetzt wurden. Zur Wiederherstellung isotonischer Bedingungen wurde die gleiche Menge dieses Mediums hinzugefügt, das zusätzlich 400 mM Sorbit und 0,8 % BSA enthielt. Nach 3 min Zentrifugation bei 250 g zur Entfernung gröberer Zellfragmente wurde der Überstand 3,5 min lang bei 2000

g zentrifugiert. Wenn Thylakoide und Mitochondrien aus temperaturbehandelten Blättern (2.2.) isoliert bzw. aus unbehandelten Blättern isolierte Thylakoide anschließend einer Hitzebehandlung in vitro unterzogen wurden, wurden sie in Waschmedium mit 300 mM Mannit als Osmotikum (s.o.) aufgenommen. Erfolgte hingegen im Anschluß an die Isolierung eine Gefrierbehandlung in vitro bzw. erhöhte Ionenbelastung bei $0^{\circ}C$, so wurden die Thylakoide zunächst einmal in Waschmedium mit 200 mM NaCl als Osmotikum (s.o.) gewaschen (3,5 min bei 2000 g) und anschließend in diesem Medium resuspendiert. Die Suspensionen wurden bis zur Messung im Eisbad bei $0^{\circ}C$ aufbewahrt.

B

Für bestimmte Untersuchungen (Einfluß der Isolationsmethode auf die Inaktivierung von Thylakoiden während des Gefrierens in vitro) wurden die nach der ersten Zentrifugation sedimentierten Chloroplasten in einem Tris-NaCl-Medium gewaschen (Santarius, 1980) und in destilliertem Wasser geschockt. Die freigesetzten Thylakoide wurden in 200 mM NaCl aufbewahrt.

### 2.3.2. Isolierung von Protoplasten

Die Isolation von Protoplasten aus nicht temperaturbehandelten Spinat- und Feldsalatblättern erfolgte nach einer von Edwards et al. (1978) entwickelten und von Hartung et al. (1980) modifizierten Methode, wobei die Zusammensetzung des Inkubationsmediums (500 mM Sorbit, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM MES-KOH, 0,5 % PVP (MG 25 000), 1 % BSA, 0,5 % Cellulase Onozuka R-10, 0,5 % Mazerozym R-10, pH 5,5) abgeändert wurde. Die Protoplasten wurden im Dunkeln bei $0^{\circ}C$ im Waschmedium aufbewahrt, welches 500 mM Sorbit, 1 mM $CaCl_2$ und 5 mM MES-KOH (pH 6,0) enthielt. Die lichtmikroskopische Kontrolle ergab, daß die Präparation vorwiegend aus intakten Protoplasten bestand.

## 2.4. Temperaturbehandlung isolierter Mitochondrien, Thylakoide und Protoplasten

### 2.4.1. Gefrieren

In Waschmedium mit 200 mM NaCl als Osmotikum (2.3.1.) suspendierte Thylakoide und Mitochondrien wurden entweder mit 200 mM NaCl oder mit verschiedenen Konzentrationen an Saccharose versetzt. Die Saccharose-Stammlösung enthielt stets 200 mM NaCl, um die Salzkonzentration im Ansatz konstant zu halten. Die Proben wurden in kleinen Plastikgefäßen in der Gefriertruhe bei -20 bis -25°C für 2-4 h in Luft (langsames Gefrieren) bzw. 10 bis 90 min in Glykoshell (schnelles Gefrieren) aufbewahrt. Unmittelbar nach dem Auftauen, welches in der Hand schnell erfolgte, wurde die biochemische Aktivität der Membransysteme bestimmt (2.6.).
Zur Untersuchung der Frage, ob die Erhöhung der Elektrolytkonzentration eine Ursache für den Gefrierschaden darstellt, wurden die in Waschmedium mit 200 mM NaCl als Osmotikum suspendierten Biomembranen mit entsprechenden Mengen an NaCl versetzt (Endkonzentrationen: bis 0,6 M bei Mitochondrien und bis 2,0 M bei Thylakoiden) und 10 bis 90 min bei 0°C inkubiert.
Proben, die über den gleichen Zeitraum bei 0°C in Waschmedium mit 200 mM NaCl als Osmotikum aufbewahrt wurden, dienten als Kontrollen.

### 2.4.2. Hitze

In Waschmedium mit 300 mM Mannit als Osmotikum (2.3.1.) suspendierte Thylakoide und Mitochondrien wurden im Wasserbad 3 min bei Temperaturen von 30-45°C inkubiert und anschließend 2 min bei 20°C aufbewahrt. In Waschmedium (2.3.2.) suspendierte Protoplasten wurden im Volumenverhältnis 1:7 in bereits auf 37-70 °C (und 100°C, siehe 2.7.) vortemperiertes Reaktionsmedium (2.6.2.3.) pipettiert und nach 3 minütiger Verweildauer bei

der jeweiligen Temperatur 2 - 5 min bei 20°C aufbewahrt. Thylakoide, Mitochondrien und Protoplasten, die über denselben Zeitraum bei 20°C inkubiert wurden, dienten als Kontrollen. Unmittelbar nach der Temperaturbehandlung erfolgte die Messung der Photosynthese- und Atmungsaktivität (2.6.2.) sowie die Aufbereitung der Protoplasten-Proben für die Bestimmung des Ioneneffluxes (2.7.2.). Hierzu wurden die Protoplasten 1 min bei 100 g sedimentiert und der sorgfältig abgesaugte Überstand bis zur Durchführung der Analysen bei -20°C aufbewahrt. Die Protoplasten wurden bis zur Bestimmung der Permeabilitätsveränderungen auf lichtmikroskopischem Wege (2.7.1.) bei 0°C aufbewahrt.

## 2.5. Chlorophyll- und Proteinbestimmungen

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach Arnon (1949). Der Proteingehalt der Mitochondrien wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt, wobei in Anlehnung an Douce et al. (1977) eine Korrektur um den Proteingehalt der die Präparation kontaminierenden Thylakoide durchgeführt wurde.

## 2.6. Messung der Photosynthese- und Atmungsaktivität

### 2.6.1. Photosynthese und Atmung ganzer Blätter

Der photosynthetische und respiratorische $CO_2$-Austausch wurde, im wesentlichen wie bei Weis (1981a) beschrieben, mit einem Infrarot- Analysator (UNOR SN-1, Maihak/Hamburg) gemessen. Hierbei wurden die Ober- und Unterseite der in die Meßküvette eingespannten Blattfläche von einem kontinuierlichen Luftstrom (300 ppm $CO_2$, 20 l/h) umspült. Die Messungen wurden bei Zimmertemperatur (23-24°C) durchgeführt. Kurzwelliges rotes Anregungslicht für die Photosynthese wurde mit einer 240 W Halogenlampe und, nach Durchtritt durch eine 2 cm dicke Wasserschicht, einer Filterkombination von einem 3 mm cutoff-Filter RG 630 (Schott & Gen.,

Mainz), einem Infrarotabsorptionsfilter Calflex C (Balzers, Liechtenstein) und einem 8 mm Wärmeabsorptionsfilter KG 3 (Schott & Gen., Mainz) erzeugt. Die Lichtintensität betrug 225 $W/m^2$ (Sättigung).

### 2.6.2. Polarographische Sauerstoffmessungen

$O_2$-Verbrauch und -Entwicklung wurden polarographisch mit einer Clark-$O_2$-Elektrode bei 20°C gemessen.

#### 2.6.2.1. Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien

Das Reaktionsmedium für die Messung des $O_2$-Verbrauchs isolierter Mitochondrien bestand aus 300 mM Mannit, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 10 mM $KH_2PO_4$, 0,2 % BSA, pH 7,2 (nach Douce et al., 1977). Als Substrate wurden 40 mM Malat + 25 mM Glutamat - letzteres dient zur Verhinderung der Akkumulation von Oxalacetat (Wiskich, 1980) - oder 10 mM Glycin verwendet. Nach Zugabe limitierter Mengen an ADP wurden ATP-Synthese, respiratorische Kontrolle (RC) und ADP/O-Werte nach Estabrook (1967) berechnet. In einigen Versuchen wurde 150/uM Dinitrophenol (DNP) als Entkoppler eingesetzt.

#### 2.6.2.2. Photosynthetische Reaktionen isolierter Thylakoide

Der Elektronentransport wurde zum einen als lichtabhängiger $O_2$-Verbrauch in Gegenwart von 20/uM Methylviologen und 1 mM KCN - letzteres dient zur Hemmung evtl. vorhandener Katalase -, zum andern als lichtabhängige $O_2$- Entwicklung in Gegenwart von 1 - 2 mM $K_3Fe(CN)_6$ und 520 U/ml Katalase gemessen. Das Reaktionsmedium bestand aus 300 mM Sorbit, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 10 mM $KH_2PO_4$, 50 mM HEPES-NaOH, 0,2 % BSA, pH 7,5 (im wesentlichen nach Klosson und Krause, 1981). Im allgemeinen wurden Thylakoide entsprechend 50/ug Chl/ml Reaktionsmedium zugegeben. Die Reaktion

wurde durch Belichtung mit kurzwelligem rotem Anregungslicht gestartet, wobei eine 150 W Halogenlampe und eine Filterkombination von zwei Infrarot-Absorptionsfiltern Calflex C (800-1000 nm; Balzers, Liechtenstein) und WG 4 ( > 1000 nm; Schott & Gen., Mainz) und einem 3 mm cutoff-Filter RG 630 bzw. RG 610 (Schott & Gen.) verwendet wurden. Die Messung fand in der Lichtsättigung statt. Nach Zugabe limitierter Mengen an ADP wurden ATP-Synthese, photosynthetische Kontrolle (PC) und ADP/O-Verhältnisse nach Robinson und Wiskich (1976) berechnet. In einigen Fällen wurde die ATP-Synthese enzymatisch bestimmt (2.6.4.). Als Entkoppler wurden 5 mM $NH_4Cl$ allein oder 5 mM $NH_4Cl$ +2 uM Gramicidin zugesetzt.

2.6.2.3. Photosynthese und Atmung isolierter Protoplasten

Das Reaktionsmedium für die Messung der photosynthetischen $O_2$-Entwicklung und des respiratorischen $O_2$-Verbrauchs bestand aus 500 mM Sorbit, 1 mM $CaCl_2$ und 30 mM HEPES-KOH, pH 7,6 (Hartung et al., 1980). Die endogene Atmung der Protoplasten wurde im Dunkeln jeweis vor und nach einer Photosynthesephase registriert. Die Zugabe verschiedener exogener Substrate stimulierte den $O_2$-Verbrauch im Dunkeln nicht; dies ist vermutlich auf Permeabilitätsbarrieren des Plasmalemmas zurückzuführen. Die Photosynthese wurde durch Zugabe von 2 mM $NaHCO_3$ und Belichtung mit kurzwelligem rotem Anregungslicht (siehe 2.6.2.2.) gestartet. Vorversuche ergaben, daß die Endkonzentration von 1 mM $CaCl_2$ ausreichte, um die $HCO_3^-$-abhängige $O_2$-Entwicklung etwaiger freier intakter Chloroplasten, die die Präparation kontaminierten, völlig zu hemmen.

2.6.3. Spektralphotometrische Messung des Elektronentransports isolierter Thylakoide

Der ET mit $K_3Fe(CN)_6$ bzw. DCPIP als Elektronenakzeptoren wurde, ähnlich wie bei Santarius und Heber (1970) sowie Heber et al.

(1973) beschrieben, mit einem Zeiss-Spektralphotometer mit angebauter Belichtungseinrichtung gemessen. Sättigendes rotes Anregungslicht wurde von einer Schott-Kaltlichtquelle, einem 3 mm cutoff-Filter RG 630 (Schott & Gen., Mainz) und einem Infrarot-Absorptionsfilter Calflex C (Balzers, Liechtenstein) erzeugt. Der Photomultiplier wurde gegen dieses Anregungslicht durch ein geeignetes Corning-Filter (9780) abgeschirmt.
Die Ferricyanid-Reduktion wurde entweder in einem isotonischen Reaktionsmedium nach 2.6.2.2. oder in einem hypotonischen Medium nach Heber et al. (1973) (13 mM Tris-HCl, 29 mM NaCl, 4 mM $MgCl_2$ und 2,25 mM $KH_2PO_4$, pH 7,8) mit 1,67 mM $K_3Fe(CN)_6$ und Thylakoiden entsprechend 20 - 25 µg Chl pro 2 ml Reaktionsansatz bei 400 nm registriert. Es wurden der basale Elektronentransport (in Abwesenheit von ADP), der gekoppelte (= state 3) ET in Gegenwart von 1 mM ADP sowie der entkoppelte ET nach Zugabe von 5 mM $NH_4Cl$ gemessen.
Die DCPIP-Reduktion wurde in einem hypotonischen Medium nach Heber et al. (1973) (50 mM TRICIN-NaOH, 5 mM $MgCl_2$, 3 mM $NaHCO_3$, pH 7,6) mit 80 µM DCPIP und Thylakoiden entsprechend 5 µg Chl pro 2 ml Reaktionsansatz in An- und Abwesenheit von 5 mM $NH_4Cl$ bei 560 nm registriert.

### 2.6.4. Enzymatische ATP-Bestimmung mit der firefly-Methode

Das Prinzip der Luciferin/Luciferase-Reaktion beruht darauf, daß D-Luciferin unter ATP-Abspaltung zu Oxyluciferin oxydiert wird. Die beim Übergang des angeregten Oxyluciferins in den Grundzustand freiwerdende Energie wird als Licht emittiert, dessen Intensität unter geeigneten Meßbedingungen der ATP-Konzentration proportional ist.
Thylakoide wurden im Licht bzw. im Dunkeln in Gegenwart von Methylviologen (zur gleichzeitigen Messung des $O_2$-Verbrauchs) und ADP inkubiert (Reaktionsmedium, Belichtungsvorrichtung: siehe 2.6.2.2.), mit $HClO_4$ (Endkonzentration 0,36 M) abgetötet, 20 min bei Zimmertemperatur stehengelassen und bis zur Weiterverarbeitung bei 0°C aufbewahrt. Die gefällten Proteine wurden

5 min bei 3000 g sedimentiert. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:10 mit 0,1 M TRA versetzt für die ATP-Bestimmung herangezogen. Eine Neutralisation der Proben war wegen des sehr geringen Probenvolumens im Reaktionsansatz (s.u.) nicht erforderlich. Zur ATP-Bestimmung im LKB-Wallac-Luminometer 1250 wurden pro Ansatz 0,4 ml Reaktionspuffer (0,1 M Tris, 2 mM EDTA, pH 7,75 mit Essigsäure), 0,05 ml ATP-"monitoring-reagent" (LKB) (enthält Luciferin und Luciferase) und 15 oder 20 µl Probe eingesetzt. Die Lichtemission wurde mit Hilfe eines Schreibers registriert. Durch Zugabe genau definierter ATP-Mengen wurde eine Eichkurve erstellt, anhand derer der ATP-Gehalt der Proben ermittelt wurde.

## 2.7. Charakterisierung der Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma an isolierten Protoplasten

### 2.7.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der Permeabilität für Neutralrot und Evan's Blau

Der Zusammenbruch der Semipermeabilität des Plasmalemmas wurde anhand der Anfärbbarkeit der Protoplasten mit Evan's Blau beobachtet (Gaff und Okong'o-Ogola, 1971; Ruesink, 1980). Die Fähigkeit der Vakuolen, Neutralrot zu akkumulieren, diente als Maß für die Intaktheit des Tonoplasten (Levitt, 1974). Die Protoplasten wurden nach der Erhitzung und vorübergehenden Aufbewahrung im Eisbad (2.4.2.) bei Zimmertemperatur in demselben Reaktionsmedium (pH 7,6), in dem die Hitzebehandlung stattgefunden hatte, mit 0,5 % Evan's Blau bzw. 0,05 % Neutralrot (Endkonzentrationen) inkubiert. Der Prozentsatz gefärbter Protoplasten wurde in einer Thomakammer unter dem Phasenkontrastmikroskop ermittelt.

2.7.2. Messung des Ioneneffluxes

Der Ionenaustritt aus den Protoplasten nach Erhitzen ist ein direktes Maß für den Semipermeabilitätsverlust des Plasmalemmas; indirekt läßt er gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Intaktheit des Tonoplasten zu (vgl. Kap. 3.2.3. und 4.2.3.). Überstände von Protoplasten, die 3 min bei 20°C bzw. bei 100°C inkubiert worden waren, dienten als Kontrollen (siehe 2.4.2.). Die pH-Werte des Wasch- und Reaktionsmediums (2.3.2. bzw. 2.6.2.3.) wurden anstelle von KOH mit NaOH eingestellt. Zur Charakterisierung des Gesamtioneneffluxes wurden Leitfähigkeitsmessungen mit einem Konduktometer (WTW, Weilheim) bei 25°C durchgeführt. 10 mM KCl diente als Standard. Der Kaliumefflux wurde emissionsspektroskopisch an einem Flammenphotometer (Zeiss) bei 769 nm gemessen. Preßluft und Acetylen wurden als Träger- bzw. Brenngas verwendet. Der $K^+$-Gehalt der Proben wurde anhand einer Eichkurve (0,05 - 1,0 mM KCl) ermittelt. Der Chlorideffluxwurde mit einem Micro-Chlor-o-Counter (Fa. Marius, Krimpen/Holland) bestimmt.

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Gefrieren

Frühere Untersuchungen zeigen, daß der Verlauf der Gefrierinaktivierung der Photosynthese und der energiekonservierenden Reaktionen der Thylakoide in gehärteten und ungehärteten Spinatblättern der gleiche ist, wobei die Schädigung bei frostgehärtetem Material lediglich bei tieferen Temperaturen einsetzt (Klosson und Krause, 1981). Deshalb wurden sämtliche in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse unter Verwendung von Gewächshausspinat gewonnen, welcher zuvor keiner spezifischen Härtungsprozedur unterzogen worden war.

### 3.1.1. Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach Gefrieren in vitro

Es konnte demonstriert werden, daß sowohl isolierte pflanzliche Mitochondrien (Thebud, 1979; Thebud und Santarius, 1981) als auch Thylakoidmembranen (Heber und Santarius, 1964; ferner z.B. Heber et al., 1979; 1981) durch Gefrieren in vitro in Abwesenheit von Schutzstoffen geschädigt werden.

Ein Vergleich der Frostempfindlichkeit dieser Biomembransysteme erscheint sinnvoll, wenn beide unter vergleichbaren Bedingungen, d.h. aus demselben Blattmaterial, gleichzeitig in einem Präparationsgang und unter Verwendung ähnlicher Medien isoliert werden, und wenn das Gefrieren unter identischen Konditionen stattfindet. Dazu wurde eine Methode entwickelt (2.3.1.), bei der geringfügige Unterschiede in der Zusammensetzung der während der Isolierung verwendeten Medien eine möglichst hohe funktionelle Intaktheit beider Biomembransysteme gewährleisten sollten. Für das Isolierungsmedium erwies sich Mannit als geeignetes Osmotikum; zur Schaffung annähernd isotonischer Bedingungen nach dem Schocken der Chloroplasten wurde ein Sorbit-haltiges Medium

verwendet. Diese als Frostschutzstoffe wirkenden Zuckeralkohole wurden jedoch anschließend durch Waschmedium mit 0,2 M NaCl ersetzt, um eine graduelle Schädigung während des Gefrierens beobachten zu können. Die ungefrorenen Kontrollen, die ebenso in Waschmedium mit 0,2 M NaCl als Osmotikum suspendiert waren, wiesen nach 4-5 stündiger Aufbewahrung bei 0°C keinen beträchtlichen Aktivitätsverlust auf.

Tab. I zeigt, daß Mitochondrien und Thylakoide nach Gefrieren in vitro in Abwesenheit von Schutzstoffen auf unterschiedliche Weise geschädigt werden.
Bei Mitochondrien werden sowohl die Elektronentransportrate (um ca. 60 %) als auch die Rate der oxidativen Phosphorylierung (um ca. 80 %) erniedrigt. Da die ATP-Synthese in größerem Ausmaß gehemmt wird, sinken die ADP/O-Werte ebenfalls, wenn auch in geringerem Umfang (um ca. 50 %). Das ADP/O-Verhältnis gibt an, wieviel ATP gebildet wird, während 2 Elektronen zum Sauerstoff transportiert werden und ist somit ein Maß für die energetische Wirksamkeit des Elektronentransports bzw. für die Kopplung zwischen ET und Phosphorylierung. Die respiratorische Kontrolle ist nach Gefrieren zwar im Vergleich zu den ungefrorenen Proben deutlich erniedrigt (um ca. 70 %), aber nicht völlig aufgehoben. Im Gegensatz zu den Mitochondrien weisen Thylakoide, die einer identischen Frostbehandlung unterzogen worden sind, einen völligen Verlust der photosynthetischen Kontrolle auf und sind nicht mehr in der Lage, ATP zu synthetisieren. Der Elektronentransport hingegen wird nicht gehemmt, sondern stark - um einen Faktor größer als 3 - stimuliert.
Sowohl bei Mitochondrien als auch bei Thylakoiden wurde der Elektronentransport unter state 3 - Bedingungen gemessen. Dies ist nach der Definition von Chance und Williams (1955) der ET in Gegenwart von Substrat bzw. Elektronenakzeptor, $P_i$ und ADP, d.h. der gekoppelte Elektronentransport. Die frostinduzierte Stimulation des Elektronentransports der Thylakoide bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphorylierung ist auf Entkopplung zurückzuführen. Da nach Gefrieren der Mitochondrien nicht nur die Rate des state 3 - ET, sondern ebenso die ADP/O-Werte erniedrigt

Tabelle I Inaktivierung von Mitochondrien und Thylakoiden nach Gefrieren in vitro in Waschmedium mit 0,2 M NaCl als Osmotikum

| | Mitochondrien | | Thylakoide | |
|---|---|---|---|---|
| | A | B | A | B |
| ET (state 3) | 50 - 90 | 36 ± 3,7 | 40 - 70 | 376 ± 39 |
| ATP-Synthese | 140 - 300 | 19 ± 2,6 | 80 - 115 | 0 |
| RC / PC | 2,3 - 3,4 | 29 ± 6,4 | 1,8 - 2,8 | 0 |
| ADP/O | 1,6 - 2,0 | 52 ± 7,9 | 0,7 - 1,1 | 0 |

A : Werte der ungefrorenen Kontrollen ($0^{\circ}C$)

B : Aktivität nach dem Frieren in % der ungefrorenen Kontrollen

Die Raten der ungefrorenen Kontrollen sind wie folgt angegeben:

Mitochondrien: nmol $O_2$ (ATP) / mg Mitochondrienprotein x min;
Substrat: Malat + Glutamat

Thylakoide: µmol $O_2$ (ATP) / mg Chl x h; Elektronenmediator: MV

Gefrierbedingungen: -20 bis $-25^{\circ}C$, 2-4 h, in Luft

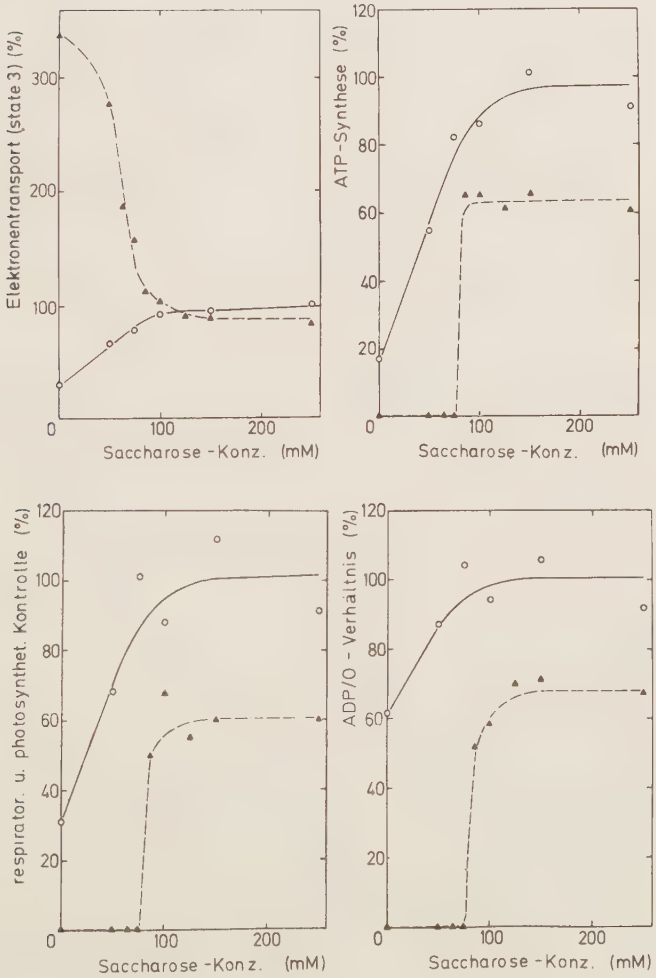
Mittelwerte von 7 Experimenten

werden, ist nicht auszuschließen, daß auch der Hemmung des $O_2$-Verbrauchs eine partielle Entkopplung überlagert ist.
Die respiratorische (RC) bzw. photosynthetische (PC) Kontrolle sind definiert als die ET-Rate in state 3 dividiert durch die ET-Rate in state 4. Als state 4 bezeichnet man den Zustand der ET-Kette in Gegenwart von Substrat bzw. Elektronenakzeptor und $P_i$, nachdem das zu Beginn von state 3 zugegebene ADP phosphorylliert worden ist. Die Höhe der RC- und PC-Werte ist ein Maß für die Kontrolle des ET durch die angekoppelte Phosphorylierung.

Um eine partielle Schadsetzung an Mitochondrien und Thylakoiden nach Gefrieren in vitro zu erreichen, wurden die aus demselben Blattmaterial isolierten Membransysteme bei der gleichen Gefriertemperatur in Gegenwart einer konstanten NaCl-Menge mit abgestuften Konzentrationen eines wirksamen Frostschutzstoffs - Saccharose - gefroren. Es ist zu erwarten, daß die frostempfindlichere Membran eine höhere Schutzstoffkonzentration im Vergleich zur unempfindlicheren benötigt, damit nach dem Auftauen eine bestimmte Aktivität erhalten bleibt.
Die Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt.
Unabhängig davon, ob Malat + Glutamat (nicht abgebildet) oder Glycin als Substrat verwendet werden, schützt Saccharose die Atmungsaktivität der Mitochondrien schon bei niedrigen Konzentrationen. So bleiben z.B. nach Gefrieren in Gegenwart von 75 mM Saccharose der Elektronentransport und die ATP-Synthese zu ca. 80 % erhalten, und die respiratorische Kontrolle sowie die im ADP/O-Verhältnis zum Ausdruck kommende energetische Wirksamkeit des ET erreichen bereits die Werte der ungefrorenen Kontrollen. Unter diesen Bedingungen ist die Photophosphorylierung der Thylakoide noch inaktiviert, und die entkopplungsbedingte Stimulation des ET ist noch evident. Erst in Gegenwart höherer Saccharose-Konzentrationen werden auch die Thylakoide geschützt. Das absolute Ausmaß des Schutzes kann sowohl bei Mitochondrien als auch bei Thylakoiden von einer Präparation zur andern leicht variieren. Jedoch benötigen unter identischen Gefrierbedingungen Thylakoide stets höhere Saccharose-Mengen,

Abb. 1 Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach Gefrieren in vitro in Gegenwart von 0,2 M NaCl und 0 - 0,25 M Saccharose

(Legende s.S. 22)



um ein den aus demselben Blattmaterial stammenden Mitochondrien vergleichbares Ausmaß an Schutz zu erreichen. Dies zeigt, daß die Chloroplastenmembranen empfindlicher gegenüber einer Frostbehandlung in vitro sind als Mitochondrien, zumindest was die hier gewählten Gefrierbedingungen anbetrifft.

Mitochondrien, die gleichzeitig mit Thylakoiden in einem Präparationsgang erhalten wurden (Tab. I, Abb. 1) und solche, die separat isoliert worden sind (Thebud und Santarius, 1981), weisen ein ähnliches Ausmaß und einen vergleichbaren Verlauf der Frostschädigung bzw. des Schutzes vor Gefrierinaktivierung auf. Bei Thylakoiden, die nach der in 2.3.1.A beschriebenen Methode isoliert worden sind, zeigen sich jedoch nach Gefrieren in vitro einige Abweichungen gegenüber früheren Resultaten (Heber und Santarius, 1964; Heber et al., 1973; Volger et al., 1978), wobei die sehr starke Beschleunigung des gekoppelten Elektronentransports besonders auffällt.

In früheren Untersuchungen über die Wirkung des Gefrierens auf Thylakoidmembranen wurden die Chloroplasten in Tris-NaCl-Medien isoliert. Zur Klärung der Frage, ob die Isolationsmethode den Ablauf der Gefrierinaktivierung und des Schutzes beeinflußt, wurden Thylakoide miteinander verglichen, die aus demselben Blattmaterial, aber nach verschiedenen Techniken isoliert worden sind. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

---

Legende zu Abb. 1:

——— o ——— Mitochondrien

- - - - ▲ - - - - Thylakoide

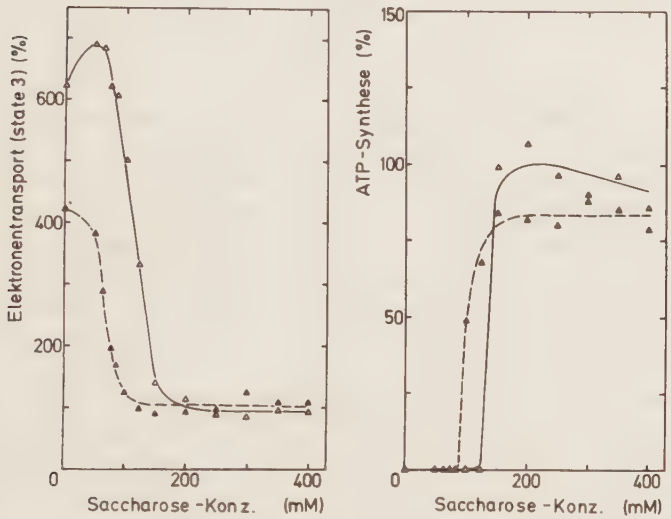
Aktivität der ungefrorenen Kontrollen (= 100%):

Mitochondrien: 69 (220) nmol $O_2$ (ATP) / mg Mitochondrienprotein x min; RC 3,11; ADP/O 1,56; Substrat: Glycin

Thylakoide: 46 (71) µmol $O_2$ (ATP) / mg Chl x h; PC 2,23; ADP/O 0,79; Methylviologen

Gefrierbedingungen: -20°C, 2-4 h, in Luft

Abb. 2 Einfluß der Isolationsmethode auf die Empfindlichkeit von Thylakoiden gegenüber Gefrieren in vitro




Die aus demselben Blattmaterial stammenden Thylakoide wurden wie folgt isoliert:

---- ▲ ---- wie in 2.3.1.A angegeben. Die Thylakoide wurden im Waschmedium mit 0,2 M NaCl als Osmotikum aufgenommen und in Gegenwart verschiedener Saccharose-Konzentrationen gefroren.

—— △ —— wie in 2.3.1.B angegeben. Die nach der ersten Zentrifugation pelletierten Chloroplasten wurden im Tris-NaCl-Medium gewaschen, in destilliertem Wasser geschockt und die Thylakoide in Gegenwart von 0,2 M NaCl bei 0°C aufbewahrt bzw. in Gegenwart verschiedener Saccharose-Konzentrationen gefroren.

Gefrierbedingungen: -20°C, 2-4 h, in Luft

Aktivität der ungefrorenen Kontrollen (= 100 %):

▲ (△): 66 (56) / umol $O_2$/mg Chl x h, 114 (97) / umol ATP/mg Chl x h; Methylviologen

Es zeigt sich, daß in Tris-NaCl-Medien isolierte Chloroplastenmembranen empfindlicher gegenüber Gefrieren in vitro sind als Thylakoide, welche in Mannit- bzw. Sorbit-Medien (2.3.1.A) gewonnen wurden (vgl. Tab. I, Abb. 1). Das ist zum einen daraus ersichtlich, daß erstere in Abwesenheit ausreichend hoher Saccharose-Konzentrationen stärker entkoppelt werden. Dies kommt in der höheren Stimulation des gekoppelten Elektronentransports zum Ausdruck. Zum andern ist eine größere Saccharose-Konzentration nötig, um die ATP-Synthese von Thylakoiden, die in Tris-NaCl-Medien isoliert worden sind, zu erhalten. Das generelle Inaktivierungsmuster von Thylakoiden nach Gefrieren in vitro - eine entkopplungsbedingte Stimulation des Elektronentransports verbunden mit einem Zusammenbruch der Photophosphorylierung - tritt jedoch unabhängig davon auf, welche Isolierungsmethode gewählt wurde.

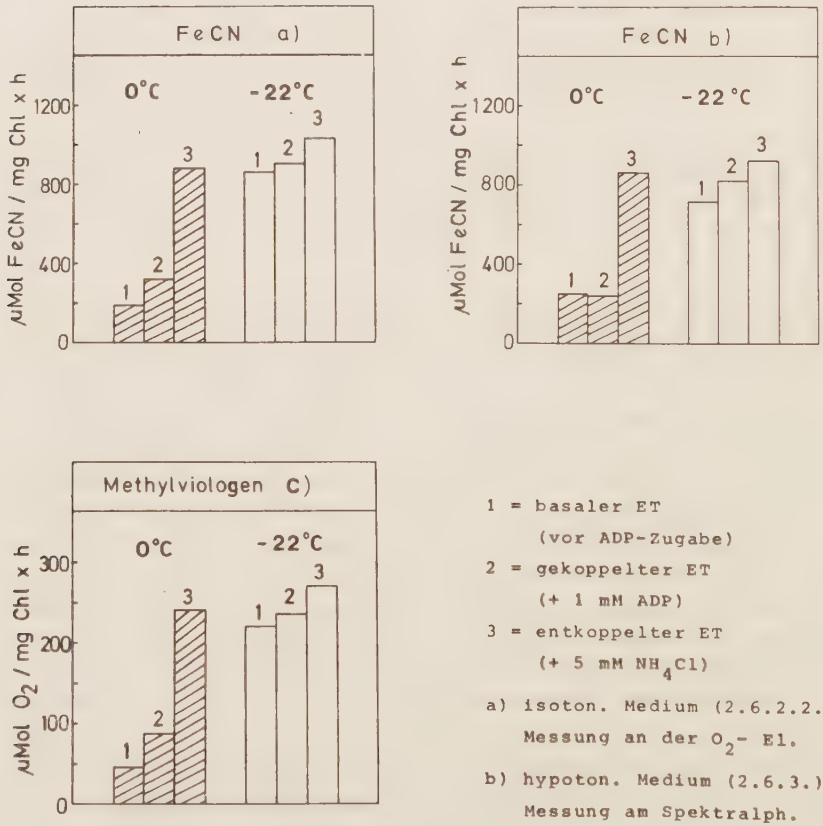
In früheren Untersuchungen, die eine gefrierinduzierte Stimulation des gekoppelten Elektronentransports auf maximal 200 % der Aktivität der ungefrorenen Kontrollen erkennen ließen (Heber und Santarius, 1964; Heber et al., 1973; Volger et al., 1978; Krause et al., 1982), wurde im allgemeinen Ferricyanid als Elektronenakzeptor verwendet. Ferricyanid kann nun, je nach Intaktheitsgrad der Thylakoide, die Elektronen entweder von PS II oder von PS I übernehmen (Trebst, 1972; Izawa, 1980). Das in den weiter oben dargestellten Versuchen verwendete Methylviologen greift hingegen aufgrund seines stark negativen Redoxpotentials ($E_o'$=-0,44 V) (Izawa, 1980) die Elektronen stets hinter PS I ab, so daß der ET über die gesamte Kette von der Wasserspaltung bis hinter PS I erfaßt wird.

Es ist möglich, daß die Wahl des Elektronenakzeptors für das in Tab. I und Abb. 1-2 dargestellte hohe Ausmaß der gefrierinduzierten Stimulation des gekoppelten Elektronentransports verantwortlich ist. Um dies zu prüfen, wurde der ET von Thylakoiden, welche aus demselben Präparationsgang stammten und in Waschmedium mit 0,2 M NaCl als Osmotikum in Abwesenheit eines Schutzstoffs gefroren bzw. als Kontrolle bei 0°C aufbewahrt

wurden, sowohl in Gegenwart von MV als auch nach Zugabe von FeCN und - im Fall von FeCN - unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Ferner wurden hier zusätzlich zu dem in Tab. I und Abb. 1-2 dargestellten gekoppelten ET der Thylakoide der basale ET (vor ADP-Zugabe) und der mit 5 mM $NH_4Cl$ entkoppelte ET registriert.

Werden Ferricyanid (Abb. 3 a+b) oder Methylviologen (Abb. 3c) als Elektronenakzeptoren verwendet, so tritt bei den ungefrorenen Kontrollen im allgemeinen eine Stimulation des basalen ET nach ADP-Zugabe ein. Warum diese in Gegenwart von FeCN im hypotonischen Reaktionsmedium nicht erfolgt, ist unbekannt. Durch die einsetzende ATP-Synthese wird der Protonengradient, der in Abwesenheit phosphorylierender Agentien bis zu 4 pH-Einheiten betragen kann (Avron, 1977), jedoch nicht völlig, sondern nur um einen limitierten Betrag (ca. 0,5 pH-Einheiten; Shavit,1980) abgebaut. Eine nahezu völlige Aufhebung des $H^+$-Gradienten und damit eine weitaus größere Stimulierung des ET tritt deshalb erst nach Entkopplerzugabe ein. Nach Gefrieren der Thylakoide wird der basale ET in Gegenwart von MV bzw. FeCN so stark stimuliert, daß durch ADP-Zugabe kaum noch eine weitere Beschleunigung erfolgt. Die Raten des basalen ET steigen auf 300-500 % und die des gekoppelten ET auf ca. 300 % der Aktivität der ungefrorenen Kontrollen an. Der entkoppelte ET wird durch Frieren nicht beeinflußt bzw. erfährt noch eine geringe Stimulierung. Letztere dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die gefrierinduzierte Entkopplung stärker ist als die bei $0^oC$ durch Zugabe von 5 mM $NH_4Cl$ erzielte; offensichtlich reicht dieses zur völligen Aufhebung des $H^+$-Gradienten nicht immer aus (vgl. auch Tab. II). Aus diesem Grunde wurde bei späteren Messungen (Abb. 7+8) zusätzlich 2 µM Gramicidin zugefügt, welches den mit 5 mM $NH_4Cl$ entkoppelten ET der Thylakoide, die bei $0^oC$ aufbewahrt worden sind, um den Faktor 1,3 (MV) bzw. 1,4 (FeCN) steigern konnte. Der in Gegenwart von FeCN und MV gemessene ET erfährt nach Gefrieren der Thylakoide in vitro unabhängig von den Meßbedingungen eine ähnliche Beeinflussung (Abb. 3 a-c). Wird hingegen DCPIP als Elektronenakzeptor verwendet, dessen oxidierte Form die Thylakoide zu einem gewissen Grad entkoppelt (Trebst, 1972),

Abb. 3 Basaler, gekoppelter und entkoppelter Elektronentransport in Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren nach Gefrieren von Thylakoiden in vitro bzw. Aufbewahren bei 0°C in Gegenwart von 0,2 M NaCl




1 = basaler ET
(vor ADP-Zugabe)
2 = gekoppelter ET
(+ 1 mM ADP)
3 = entkoppelter ET
(+ 5 mM $NH_4Cl$)

a) isoton. Medium (2.6.2.2.)
Messung an der $O_2$- El.

b) hypoton. Medium (2.6.3.)
Messung am Spektralph.

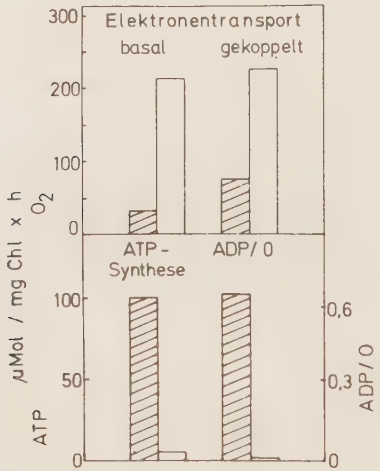
Gefrierbedingungen: -22°C, 2 1/4 - 3 3/4 h, in Luft

so wird der basale ET der ungefrorenen Kontrollen nach Entkopplerzugabe nur geringfügig stimuliert. Bei frostgeschädigten Thylakoiden weisen weder basaler noch entkoppelter ET im Vergleich zu den Kontrollen eine Beschleunigung auf (nicht abgebildet).

Die Ergebnisse zeigen, daß in einem schon bei 0°C entkoppelten System nach Gefrieren keine weitere nennenswerte Stimulierung des ET zu erwarten ist. Somit könnte die früher beobachtete geringere Stimulation des gekoppelten ET nach Gefrieren evtl. darauf beruhen, daß die Thylakoide, bedingt durch die längere Isolierungsdauer und das Fehlen von $Mg^{++}$ während der gesamten Isolierung und Aufbewahrung, schon bei 0°C etwas entkoppelt waren. Ferner ist natürlich nie auszuschließen, daß gewisse materialabhängige Unterschiede eine verschieden hohe Beschleunigung des ET nach Gefrieren bewirken können (vgl. z.B. den ET in Abb. 1+2 mit Abb. 3c).

Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß nach Gefrieren von Thylakoiden in Abwesenheit von Schutzstoffen der basale ET durch Zugabe von ADP noch etwas stimuliert werden kann, wenn auch in weit geringerem Ausmaß als bei den ungefrorenen Membranen. Photosynthetische Kontrolle findet jedoch nicht statt, so daß ATP-Synthese bzw. ADP/O-Werte nach Robinson und Wiskich (1976) nicht zu ermitteln sind. Um zu prüfen, ob und in welchem Ausmaß unter diesen Bedingungen die nichtzyklische Photophosphorylierung noch ablaufen kann, wurde die ATP-Synthese enzymatisch nach der firefly-Methode bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Es zeigt sich, daß nach einer gefrierinduzierten 6- bzw. 3-fachen Stimulation des basalen bzw. gekoppelten ET die ATP-Synthese auf ca. 5 % der Aktivität der ungefrorenen Kontrollen gesunken ist. Da der $O_2$-Verbrauch gleichzeitig beschleunigt ist, beträgt das ADP/O-Verhältnis nur noch ca. 2 % des Kontrollwerts, d.h. der ET läuft nahezu ohne energetische Wirksamkeit ab, was die weiter oben angeführten Daten bestätigt. Somit ist bei Chloroplastenmembranen, die nach Gefrieren in Abwesenheit eines Schutzstoffs so stark entkoppelt sind, daß der beschleunigte

Abb. 4 Elektronentransport und ATP-Synthese (Messung enzymatisch) von Thylakoiden nach Gefrieren in vitro bzw. Aufbewahrung bei 0°C in Gegenwart von 0,2 M NaCl



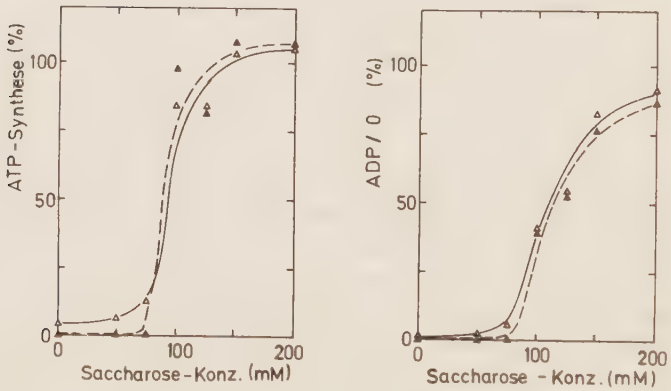

Gefrierbedingungen: -21°C, 2 3/4 - 3 3/4 h, in Luft
Elektronenmediator: Methylviologen
schraffiert: 0°C; weiß: -21°C

basale ET nur noch geringfügig durch ADP stimuliert wird, auch auf enzymatischem Wege nahezu keine ATP-Synthese mehr nachzuweisen.

Im folgenden soll geprüft werden, ob dies auch für Thylakoide gilt, deren ET nach Gefrieren in Anwesenheit von Schutzstoffen weniger stark entkoppelt worden ist (vgl. Abb. 2, 50 - 100 mM Saccharose bei ▲ ). Dazu wurden von Thylakoiden, die in vitro in Gegenwart abgestufter Saccharose-Konzentrationen gefroren worden waren, die nichtzyklische Photophosphorylierung und die ADP/O-Werte zum einen indirekt nach Robinson und Wiskich (1976), zum andern anhand einer ATP-Bestimmung auf enzymatischem Wege ermittelt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Es zeigt sich, daß in den Fällen, in denen ATP-Synthese auf rechnerischem Wege nicht mehr bestimmt werden kann, mit der firefly-Methode noch Phosphorylierung bis zu ca. 15 % und ADP/O-Werte bis zu ca. 5 % der Aktivität der ungefrorenen Kontrollen nachzuweisen sind. Im Bereich höherer Saccharosekonzentrationen (ab 100 mM), bei denen im allgemeinen keine entkopplungsbedingte Stimulation des ET mehr zu beobachten ist (vgl. Abb 1+2), unterscheiden sich die nach verschiedenen Methoden ermittelten Schutzkinetiken jedoch nicht. Ähnlich ergeben sich bei Mitochondrien, deren gekoppelter ET nach einer Gefrierbehandlung in vitro im Gegensatz zu dem der Thylakoide gehemmt wird, bzgl. Ausmaß und Verlauf des Schadens bzw. Schutzes vor Gefrierinaktivierung durch Saccharose keine Unterschiede zwischen analog zu Estabrook (1967) berechneten und anhand einer ATP-Bestimmung auf enzymatischem Wege ermittelten Phosphorylierungsraten und ADP/O-Werten (nicht abgebildet).

Die bisherigen Ergebnisse (Tab. I, Abb. 1-5) zeigen, daß ATP-Synthese, respiratorische bzw. photosynthetische Kontrolle und ADP/O-Werte sowohl bei Mitochondrien als auch bei Thylakoiden - wenn auch bei beiden Biomembranen in unterschiedlichem Ausmaß - nach Frosteinwirkung in vitro in Gegenwart von NaCl gesenkt werden. Im Gegensatz dazu wird der gekoppelte Elektronentransport bei diesen Biomembransystemen auf völlig unterschiedliche Weise beeinflußt: während bei Mitochondrien eine Hemmung erfolgt, erfährt der ET der Thylakoide eine drastische entkopplungsbedingte Stimulierung.

Abb. 5 NCPP und ADP/O-Werte von Thylakoiden nach Gefrieren in vitro: Vergleich der Zuckerschutzkinetiken nach Bestimmung der ATP-Syntheserate auf enzymatischem bzw. indirektem Weg nach Robinson und Wiskich (1976)




Gefrierbedingungen: -21,5°C, 2 - 3 1/2 h, in Luft
Bestimmung der NCPP in Gegenwart von Methylviologen:

▲ ---- ▲ nach Robinson und Wiskich (1976)
△ —— △ enzymatisch (firefly-Methode)

Aktivität der ungefrorenen Kontrollen (= 100 %):
▲ ( △ ) 115 (83) µmol ATP/mg Chl x h, ADP/O 0,95 (0,64)

### 3.1.2. Versuche zur Simulation des Gefrierschadens durch Einwirkung hoher Elektrolytkonzentrationen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts

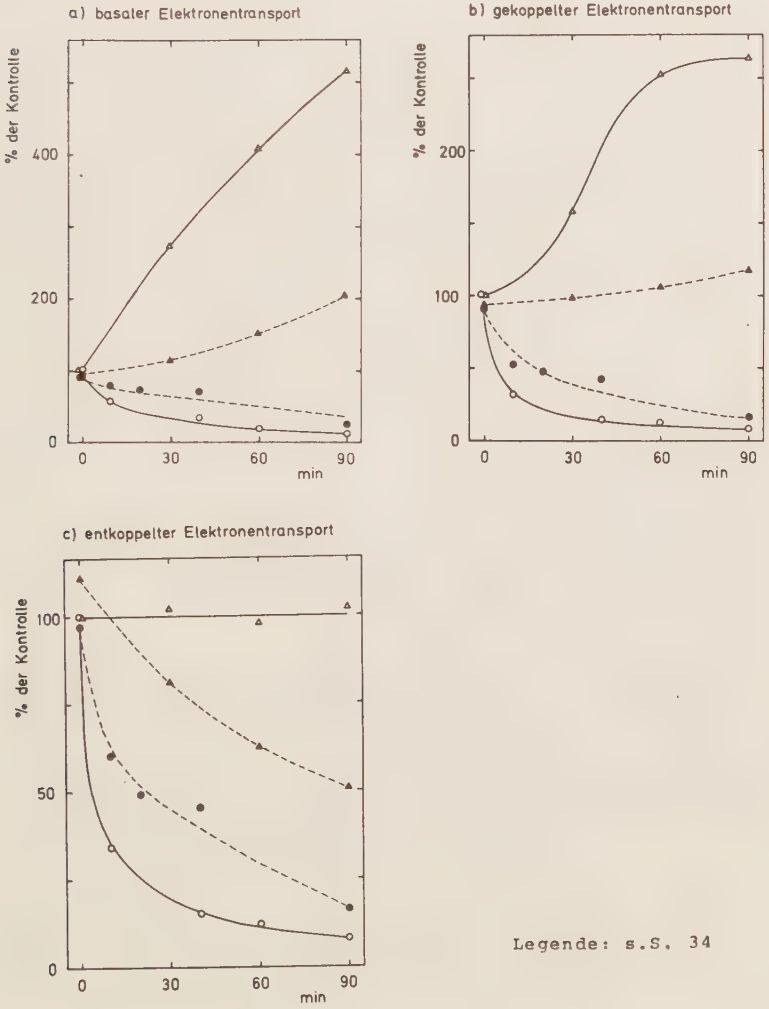
Die Konzentrierung potentiell membrantoxischer Substanzen in der ungefroren Restlösung während des Gefriervorgangs wurde als eine wesentliche Ursache der Membraninaktivierung angesehen (Lovelock, 1953; vgl. auch z.B. Heber und Santarius, 1973; Hel et al., 1979). Dafür spricht die Tatsache, daß hohe Konzentrationen an anorganischen Elektrolyten Mitochondrien und Thylakoide auch bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts destabilisieren (Santarius, 1969; Santarius und Heber, 1970; Thebud und Santarius, 1981). Da eine Frostbehandlung in vitro in Gegenwart anorganischer Elektrolyte auf den respiratorischen und photosynthetischen Elektronentransport in unterschiedlicher Weise einwirkt (3.1.1.), stellt sich die Frage, ob bei beiden Biomembransystemen die Erhöhung der Salzkonzentration in der ungefrorenen Restlösung für die Gefrierinaktivierung verantwortlich ist. In diesem Fall sollte der Elektronentransport von Mitochondrien und Thylakoiden durch Einwirkung hoher Elektrolytkonzentrationen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts in ähnlicher Weise beeinflußt werden wie durch eine Frostbehandlung.

In Abb. 6 a-c ist die Aktivität des basalen, gekoppelten und entkoppelten Elektronentransports von Mitochondrien und Thylakoiden dargestellt. Die Membranen wurden vor der Messung unterschiedlich lange bei $0^{\circ}C$ in Gegenwart hoher NaCl-Konzentrationen (0,6 M bzw. 1 M) bzw. bei $-21^{\circ}C$ in Anwesenheit von NaCl aufbewahrt. Dessen Ausgangskonzentration betrug vor dem Frieren 0,2 M. Es wurden relativ kurze Inkubationszeiten gewählt, um eine graduelle Beeinflussung des ET beobachten zu können. Da die $0^{\circ}C$-Proben zu Beginn mit der jeweils endgültigen NaCl-Konzentration versetzt wurden, beim Gefrieren eine Konzentrierung von gelösten Teilchen in der ungefrorenen Restlösung jedoch erst im Laufe der Temperaturerniedrigung zustandekommt, wurden die

Membransuspensionen in einem Glykoshellbad gefroren, um möglichst schnell die endgültige Gefriertemperatur und damit die endgültige Salzkonzentration zu erreichen. Bei Entnahme der ersten Probe nach 10 min waren die Membranen bereits auf -21°C abgekühlt (vgl. Santarius und Heber, 1970). Um auszuschließen, daß eine unterschiedliche Beeinflussung des ET durch verschieden hohe Elektrolytkonzentrationen im Reaktionsansatz hervorgerufen wird, wurde wie folgt verfahren. Dem Ansatz wurde vor der Messung des ET derjenigen Proben, welche in Gegenwart von 0,2 M NaCl aufbewahrt worden waren, stets soviel NaCl hinzugefügt, wie mit den Membranen, welche in Gegenwart höherer Salzkonzentrationen bei 0°C aufbewahrt worden waren, zusätzlich in die Meßküvette übertragen wurde.

Aus Abb. 6 a-c ist ersichtlich, daß bei Mitochondrien der basale, gekoppelte und entkoppelte Elektronentransport durch Gefrieren und durch Einwirkung einer hohen Salzkonzentration bei 0°C gehemmt wird. Das graduelle Ausmaß dieser Hemmung ist zu vergleichbaren Zeiten nach der Frostbehandlung stets größer als nach der Inkubation bei 0°C in Gegenwart von 0,6 M NaCl. Jedoch sind Spinatblattmitochondrien auch bei 0°C sehr empfindlich gegenüber einer verstärkten Elektrolytbelastung. Bei Aufbewahrung in Gegenwart höherer NaCl-Konzentrationen als 0,6 M, bei denen der ET der Thylakoide nach vergleichbarer Inkubationsdauer kaum beeinflußt wird (nicht abgebildet), klumpen die Mitochondrien so stark, daß die Registrierung des ET aus meßtechnischen Gründen nicht mehr möglich ist. Die Ursache für diese Verklumpung ist nicht bekannt. Sie könnte damit zusammenhängen, daß hohe Konzentrationen an Ionen im Medium durch Bindung an entgegengesetzt geladene Gruppen der Membranproteine eine Verminderung der Ladung der Membranen herbeizuführen vermögen. Dadurch könnte es zu einer Aggregation von Membranen kommen (Heber et al., 1979). Diese tritt bei Mitochondrien oberhalb des Gefrierpunkts offenbar in verstärktem Ausmaß ein. Da bei einer Temperaturerniedrigung auf -21°C die NaCl-Konzentration in der ungefrorenen Restlösung weitaus höher als 0,6 M ist und Gefrieren der Mitochondrien im Vergleich zu deren Aufbewahrung bei

Abb. 6 Elektronentransport isolierter Mitochondrien und Thylakoide nach Gefrieren in vitro bzw. Aufbewahrung bei hoher Salzkonzentration bei 0°C




Legende: s.S. 34

0°C in Gegenwart von 0,6 M NaCl in einer stärkeren Hemmung des ET resultiert, liegt der Schluß nahe, daß die Inaktivierung des respiratorischen ET durch Frosteinwirkung in vitro auf den Anstieg der Konzentration an anorganischen Elektrolyten zurückzuführen ist.

Bei Thylakoiden erfahren der basale und der gekoppelte ET, entweder in Gegenwart von Methylviologen (Abb. 6 a+b) oder mit FeCN als Akzeptor gemessen (Tab. II), sowohl nach Gefrieren als auch nach Aufbewahrung bei 0°C in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration eine Stimulierung, welche durch Entkopplung verursacht wird. Die Raten des basalen ET steigen nach 90 min Inkubation bei -21°C auf über 500 % und bei 0°C in Gegenwart von 1 M NaCl auf ca. 200 % der Aktivität der Kontrollen an. Der gekoppelte ET wird in geringerem Ausmaß beschleunigt (über 250 % bzw. ca 120 %) (vgl. Abb. 3). Die Tatsache, daß die frostinduzierte Stimulierung stärker ist als die durch Aufbewahrung bei 0°C in Gegenwart von 1 M NaCl erreichte, deutet darauf hin, daß die Entkopplung des photosynthe-

---

Legende zu Abb. 6:

—— O —— Mitochondrien
—— △ —— Thylakoide
> -21°C, Glykoshell, 0,2 M NaCl

---- ● ---- Mitochondrien — 0,6 M NaCl
---- ▲ ---- Thylakoide — 1,0 M NaCl
> 0°C

a) basaler ET (vor ADP-Zugabe)
b) gekoppelter ET: + 0,18 mM ADP
c) entkoppelter ET: + 150 µM DNP (Mit.) bzw. + 5 mM $NH_4Cl$ (Thyl.)
Aktivität der Kontrollen, die bei 0°C in Gegenwart von 0,2 M NaCl aufbewahrt wurden (=100 %):
Mitochondrien: 156 (basal), 330 (gekoppelt), 350 (entkoppelt) nmol $O_2$/ml Mitochondriensuspension x min (der Gehalt an Mitochondrienprotein wurde nicht bestimmt); Substrat: Glycin
Thylakoide: 59 (basal), 116 (gekoppelt), 350 (entkoppelt) µmol $O_2$/mg Chl x h; Methylviologen
Abszisse: Aufbewahrungsdauer

Tabelle II Elektronentransport von Thylakoiden nach Aufbewahrung in Gegenwart hoher Salzkonzentration bei $0^{\circ}C$ bzw. nach 90 min Gefrieren in vitro

Elektronenakzeptor: FeCN

| Bedingungen | Elektronentransport | | | Angabe der Aktivität in: |
|---|---|---|---|---|
| | basal | gekoppelt + 0,17 mM ADP | entkoppelt + 5 mM $NH_4Cl$ | |
| $0^{\circ}C$, 0,2 M NaCl (Kontrolle) | 66 | 113 | 277 | /umol $O_2$ / mg Chl x h |
| $0^{\circ}C$, 1,0 M NaCl | 192 | 112 | 46 | % der Kontrolle |
| $-21^{\circ}C$, 0,2 M NaCl | 523 | 305 | 125 | " " " |

Aufbewahrung in Waschmedium (2.3.1.) mit der angegebenen NaCl-Endkonzentration, welche für $0^{\circ}C$ gültig ist.
Gefrieren in Glykoshell. Messung an der $O_2$-Elektrode.

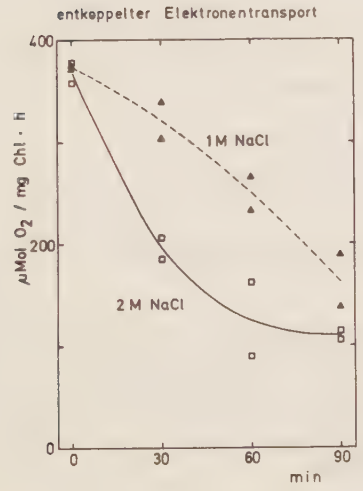
tischen ET beim Gefrieren in Anwesenheit von Salzen durch deren Konzentrationsanstieg in der ungefrorenen Restlösung hervorgerufen werden könnte.

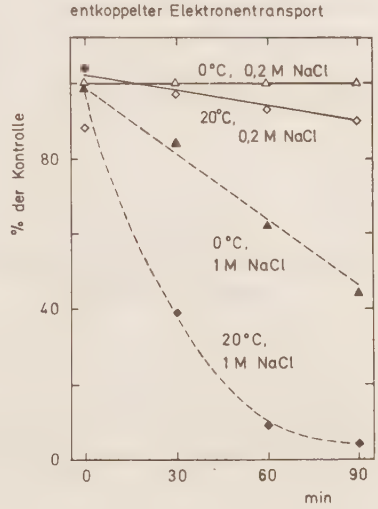
Während der entkoppelte ET der Thylakoide in Gegenwart von Methylviologen (Abb. 6c) bzw. FeCN (Tab. II) durch Gefrieren in einem NaCl-haltigen Medium nicht beeinflußt bzw. leicht stimuliert wird (Abb. 3, FeCN), erfährt er mit steigender Aufbewahrungsdauer bei $0^{\circ}C$ in Gegenwart von 1 M NaCl eine zunehmende Hemmung. Eine Verlangsamung des entkoppelten ET konnte auch beobachtet werden, wenn die Chloroplastenmembranen über einen längeren Zeitraum in einem Saccharose-Medium in Abwesenheit von NaCl inkubiert worden waren; eine 7 stündige Aufbewahrung resultierte in einer Hemmung um 34 % (Jensen, 1981). Jedoch geht durch Einwirkung hoher Salzkonzentrationen bei $0^{\circ}C$ diese Inaktivierung des entkoppelten ET viel rascher vonstatten, wobei die Geschwindigkeit der Hemmung deutlich mit steigender NaCl-Konzentration zunimmt (Abb. 7).

Anorganische Elektrolyte könnten eine Inaktivierung z.B. dadurch beschleunigen, daß sie bei höheren Temperaturen, welche eine erhöhte Membranfluidität zur Folge haben, vermehrt in die Thylakoidmembran bzw. deren Innenraum einzudringen vermögen. Dann sollte man bei einer gegebenen hohen Salzkonzentration mit steigender Temperatur eine zunehmende Hemmung des entkoppelten Elektronentransports erwarten. Abb. 8 zeigt, daß dies der Fall ist. Die Thylakoide werden nach Aufbewahrung in Gegenwart von 1 M NaCl bei $20^{\circ}C$ stärker inaktiviert als bei $0^{\circ}C$. Eine Inkubation der Membranen bei $20^{\circ}C$ in Gegenwart von nur 0,2 M NaCl führt hingegen nicht zu einer signifikanten Hemmung des entkoppelten ET. Dies und die in Abb. 7 dargestellten Daten sprechen dafür, daß die Schädigung der Thylakoide bei $20^{\circ}C$ in Gegenwart von 1 M NaCl auf einer Kombination zwischen Erhöhung der Temperatur und der Salzkonzentration beruht.

Abb. 7 (li) Hemmung des entkoppelten Elektronentransports von Thylakoiden nach Aufbewahrung in Gegenwart verschiedener NaCl-Konzentrationen bei 0°C

Abb. 8 (re) Beeinflussung des entkoppelten Elektronentransports von Thylakoiden nach Aufbewahrung in Gegenwart verschiedener NaCl-Konzentrationen bei 0°C bzw. bei +20°C




Messung des entkoppelten ET in Gegenwart von 5 mM $NH_4Cl$ + 2 µM Gramicidin (Methylviologen)
Abszisse: Aufbewahrungsdauer

zu Abb. 8: Ordinate: Werte in % der Aktivität derjenigen Kontrolle (0,2 M NaCl), die über denselben Zeitraum wie die übrigen Proben bei 0°C aufbewahrt wurde

Aktivität der Kontrollen: zu Versuchsbeginn bzw. nach 90 min: 616 bzw. 560 µmol $O_2$/mg Chl x h

Die in Kap. 3.1.2. dargestellten Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß sowohl die Hemmung des mitochondriellen ET als auch die entkopplungsbedingte Stimulierung des photosynthetisch ET der Thylakoide nach Gefrieren in Gegenwart von NaCl auf dessen Konzentrationsanstieg in der ungefrorenen Restlösung zurückzuführen sein dürfte. Die Einwirkung dieses Salzes bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts löst jedoch an Chloroplastenmembranen Inaktivierungsprozesse aus, welche nach Frosteinwirkung nicht eintreten. Dies deutet in Verbindung mit früheren Resultaten (Santarius und Heber, 1970) darauf hin, daß neben der Erhöhung der Konzentration an anorganischen Elektrolyten auch die Temperatur einen direkten Einfluß auf das Ausmaß der Schädigung von Thylakoiden ausübt.

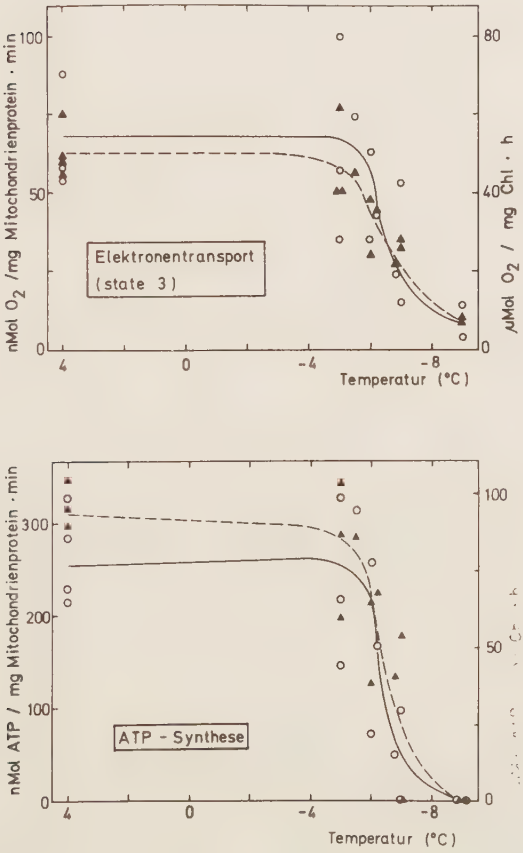
### 3.1.3. Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach Gefrieren in situ

Die bisher dargestellten Untersuchungen zeigen, daß isolierte Spinatblattmitochondrien und Chloroplastenmembranen nach Gefrieren in vitro unter nahezu identischen Bedingungen auf unterschiedliche Weise beeinflußt werden, wobei die Thylakoide eine größere Empfindlichkeit aufweisen.

Ist dies auch nach Gefrieren in situ der Fall, d.h. wenn diese Biomembranen aus frostbehandelten Blättern isoliert werden? Da bei Spinatblättern nach Gefrieren in situ die Gesamtprozesse der Atmung und Photosynthese annähernd parallel, d.h. im gleichen Temperaturbereich zusammenbrechen (Klosson und Krause, 1981; Krause et al., 1982), sollte man auch eine nahezu simultane Schädigung der Organellen erwarten. Abb. 9 zeigt, daß dies zutrifft. Mitochondrien und Thylakoide werden annähernd parallel in einem engen Temperaturbereich, d.h. nach einer zweistündigen Verweildauer bei Minimumtemperaturen zwischen -5 und -7°C, in-

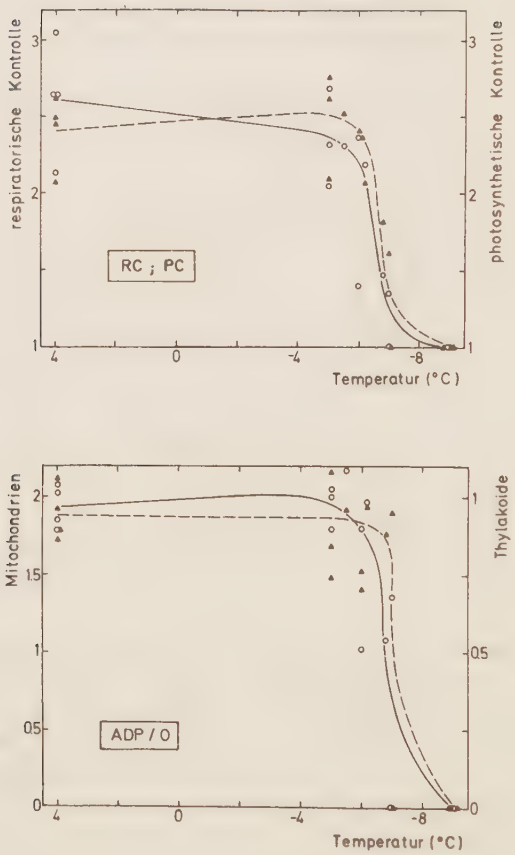
Abb. 9 Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden, die aus frostbehandelten Blättern isoliert worden sind

S. 39: ET, ATP-Synthese; S. 40: RC/PC, ADP/O




Legende: s.S.

zu Abb. 9




Die Aktivität ist als Funktion der Minimumtemperatur angegeben (Abszisse), bei der die Spinatblätter 2 h verweilten. Details zur Frostbehandlung in 2.2.1.

—— O —— Mitochondrien, ---- ▲ ---- Thylakoide

Atmungssubstrat: Malat + Glutamat

Elektronenmediator: MV

aktiviert. Bei Thylakoidmembranen, die aus frostgeschädigten Blättern isoliert worden sind, tritt bezeichnenderweise keine entkopplungsbedingte Stimulierung des Elektronentransports ein, wie sie nach Gefrieren in vitro in Abwesenheit ausreichender Schutzstoffkonzentrationen beobachtet wird (Tab. I, Abb. 1-4 und 6). Vielmehr werden der Elektronentransport und die ATP-Synthese sowohl in Mitochondrien als auch in Thylakoiden in nahezu demselben Ausmaß gehemmt. Folglich wird die in den ADP/O-Verhältnissen zum Ausdruck kommende energetische Wirksamkeit des Elektronentransports erst nach Einwirkung tieferer Temperaturen signifikant gesenkt. In diesen Fällen sind die Membranen aus Blättern isoliert worden, welche nach dem Tauen nahezu völlig wasserinfiltriert waren, d.h. eine irreversible Gewebeschädigung aufwiesen. Der noch verbleibende ET, dessen Rate nach Aufbewahrung der Blätter bei -9°C sowohl bei Mitochondrien als auch bei Thylakoiden im Mittel auf unter 15 % der Aktivität der ungefrorenen Kontrollen gesunken ist, erfährt keine Stimulierung durch ADP. Somit findet keine photosynthetische und respiratorische Kontrolle mehr statt.

Die Ergebnisse zeigen, daß - im Gegensatz zu einer Gefrierbehandlung in vitro - die Frosteinwirkung in situ zu einer simultanen Inaktivierung von Mitochondrien und Thylakoiden führt und in beiden Biomembransystemen dasselbe Schädigungsmuster der energiekonservierenden Reaktionen auslöst.

## 3.2. Hitze

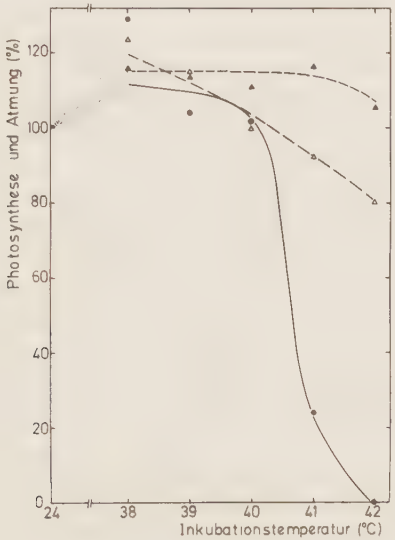
Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich damit, auf welche Weise und in welchem Ausmaß überoptimale Temperaturen Photosynthese und Atmung sowie die energiekonservierenden Reaktionen von Mitochondrien und Thylakoiden und die Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma beeinflussen.

### 3.2.1. Photosynthese und Atmung hitzebehandelter Blätter und isolierter Protoplasten

In Abb. 10 sind Photosynthese und Atmung von Spinatblättern nach einer kurzfristigen Hitzebehandlung (6 min bei 38 bis 42°C) wiedergegeben. Es zeigt sich, daß die Netto-Photosynthese bereits bei Temperaturen inaktiviert wird, welche die endogene Atmung kaum beeinflussen. In Abhängigkeit von den Außenbedingungen treten jedoch einige Unterschiede in der Atmungsaktivität auf. Bei Temperaturen, die zu einem Zusammenbruch der Photosynthese führen, ist die Atmung von vorverdunkelten Blättern im Vergleich zu den Kontrollen leicht stimuliert, während sie nach einer Belichtung der Blätter mit photosynthetisch aktivem Licht eine geringfügige Hemmung erfährt. Letztere könnte evtl. darauf zurückzuführen sein, daß mit steigender Temperatur und somit steigender Inaktivierung der Photosynthese weniger Kohlenhydrat-Intermediate gebildet werden, welche als Atmungssubstrate zur Verfügung stehen können. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, daß die Absolutraten der $CO_2$-Abgabe vorbelichteter Blätter die der Atmung verdunkelter Blätter zunächst übersteigen, nach dem Zusammenbruch der Photosynthese aber die gleiche Höhe erreichen.

Anhand der in Abb. 10 dargestellten Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Hemmung der $CO_2$-Fixierung nicht durch eine Inaktivierung des photosynthetischen Apparats, sondern durch sekundäre Vorgänge wie z.B. eine hitzeinduzierte Erhöhung des Diffusionswiderstandes für $CO_2$ im Bereich der Stomata oder des Blattgewebes hervorgerufen werden könnte. Dies bedeutet,

Abb. 10 Photosynthese und Atmung von hitzebehandelten Spinatblättern




Die Aktivität ist als Funktion der Temperatur angegeben, bei der die Blätter 6 min lang inkubiert wurden. Nach der Hitzebehandlung wurden die Blätter mindestens 90 min bei Zimmertemperatur aufbewahrt: entweder im Dunkeln zur anschließenden Messung der Dunkelatmung oder bei künstlicher Zimmerbeleuchtung und spezieller Vorbelichtung (60 W Glühlampe, 10 cm Wasserschicht), welche 20 - 30 min lang unmittelbar vor der Messung der Netto-Photosynthese und anschließend wiederum der Atmung erfolgte.

Aktivität der Kontrollen, die über den gesamten Zeitraum bei 24°C aufbewahrt worden sind, in /umol $CO_2$/mg Chl x h (= 100 %):

——— o ——— Netto-Photosynthese: 72,3

— • △ — • Atmung nach der Photosynthese: 24,2

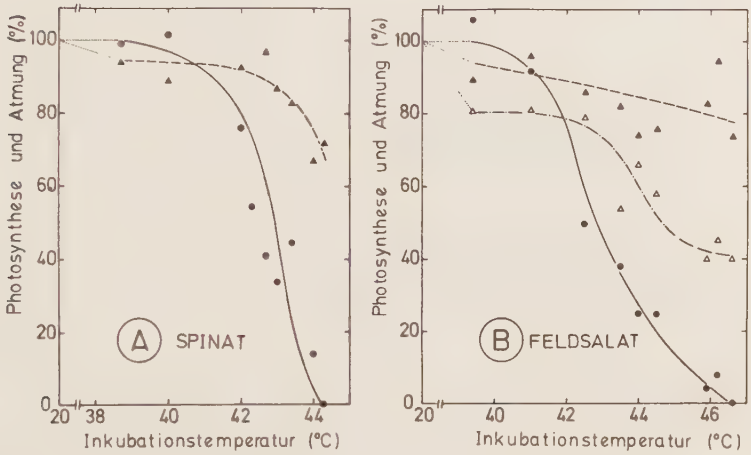
---- ▲ ---- Atmung vorverdunkelter Blätter: 18.9

daß die Rate der Netto-Photosynthese sinkt, obwohl die Licht- und Dunkelreaktionen selbst noch nicht beeinträchtigt zu sein brauchen. In diesem Fall sollte man nach einer Hitzebehandlung von isolierten Protoplasten, bei denen Schließzell- und Gewebebarrieren entfallen, keine drastisch größere Empfindlichkeit der Photosynthese im Vergleich zur Atmung erwarten. Abb. 11 bestätigt diese Vermutung jedoch nicht. Nach einer 3 minütigen Hitzebehandlung bei 43°C ist sowohl in Spinat- als auch in Feldsalat-Protoplasten die Photosynthese zu 50 % inaktiviert, während die nach einer Dunkelperiode gemessene endogene Atmung noch zu 90 % erhalten bleibt. Bei Temperaturen zwischen 44°C (Spinat) und 46-47°C (Feldsalat) sind ein völliger Zusammenbruch der Photosynthese und eine Aktivität der Atmung in Höhe von 70 - 80 % der Kontrollen zu beobachten. Die in Relation hierzu stärkere Inaktivierung der Atmung, welche nach einer Photosyntheseperiode gemessen wurde (Abb. 11 B), könnte ähnlich wie für Abb. 10 angegeben erklärt werden.

Bei Präparationen sowohl von Spinat- als auch von Feldsalat-Protoplasten aus verschiedenem Ausgangsmaterial ist der Temperaturbereich, in dem die Inaktivierung der Photosynthese stattfindet, nicht völlig identisch. Die in Abb. 11 dargestellten Ergebnisse lassen also nicht den Schluß zu, daß der photosynthetische Apparat von Spinat hitzeempfindlicher als der von Feldsalat ist. Sie demonstrieren vielmehr, daß die höhere Thermosensitivität der Photosynthese im Vergleich zur Atmung bei verschiedenen Pflanzenarten nachzuweisen ist, was durch andere Untersuchungen bestätigt wird (vgl. Levitt, 1980).

Die geringfügige Depression der endogenen Atmung isolierter Protoplasten (Abb. 11) nach Einwirkung von Temperaturen, welche eine Inaktivierung der Photosynthese herbeiführen, dürfte wohl nicht auf eine höhere Thermolabilität der außerhalb der Mitochondrien ablaufenden Glykolyse zurückzuführen sein. In diesem Fall sollte man auch eine Erniedrigung der Atmung vorverdunkelter Blätter erwarten, die jedoch nicht eintritt (Abb. 10). Die

Abb. 11 Photosynthese und Atmung von hitzebehandelten isolierten Protoplasten




Die Aktivität ist als Funktion der Temperatur angegeben, bei der die Protoplasten 3 min lang inkubiert wurden.

Aktivität der Kontrollen, welche 3 min lang bei 20°C inkubiert worden sind, in µmol $O_2$/mg Chl x h (=100 %):

—— O —— Netto-Photosynthese: A 69,2; B 97,3

— · △ — · Atmung nach der Photosynthese: B 18,0

---- ▲ ---- Atmung vor der Photosynthese: A 11,8; B 8,0

Ursache dürfte wohl eher in einem passiven Leckfluß von Substraten ins Außenmedium beruhen, welcher während der Isolierung und Aufbewahrung der Protoplasten eingetreten sein könnte. Daß bereits während der Protoplastenisolierung ein signifikanter Leckfluß gelöster Stoffe aus dem Gewebe stattfindet, ist nachgewiesen worden (Taylor und Hall, 1976).

### 3.2.2. Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach Hitzebehandlung in situ und in vitro

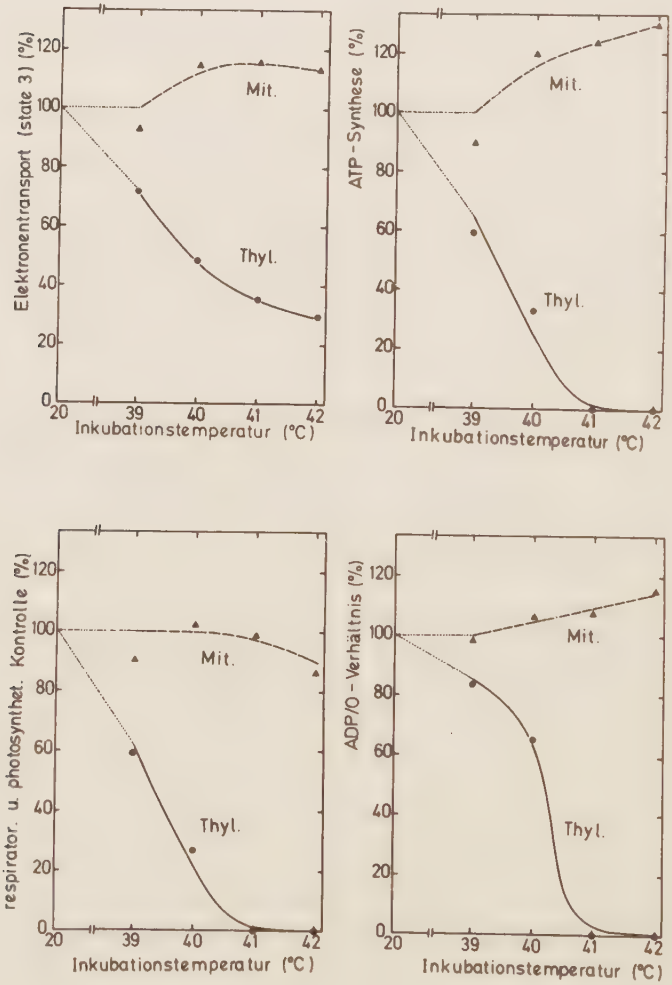
Anhand der bisherigen Ergebnisse stellt sich die Frage, ob sich die unterschiedliche Hitzeempfindlichkeit von Atmung und Photosynthese auch in den energiekonservierenden Reaktionen der Mitochondrien und Thylakoide manifestiert. Um dies zu untersuchen, wurde die Aktivität dieser Biomembranen bestimmt, nachdem sie einer Hitzebehandlung in situ bzw. in vitro unterzogen worden waren. Zur Schaffung gleicher Bedingungen wurden auch hier wieder Mitochondrien und Thylakoide gleichzeitig in einem Präparationsgang (3.1.1. S. 17) aus demselben ungeschädigten bzw. temperaturbehandelten Blattmaterial isoliert. Die Hitzebehandlung in vitro fand in einem für beide Biomembranen identischen Medium (Waschmedium mit 0,3 M Mannit als Osmotikum) statt.

In Abb. 12 ist die Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach einer Hitzebehandlung in situ dargestellt. Bei Temperaturen, die zu einem nahezu völligen Zusammenbruch der photochemischen Reaktionen der Thylakoide führen (41-42°C), werden Elektronentransport und ATP-Synthese der Mitochondrien, in Gegenwart exogener Substrate gemessen, nicht gesenkt, sondern im Vergleich zu den Kontrollen sogar leicht stimuliert. Da die oxidative Phosphorylierung eine größere Beschleunigung erfährt als der $O_2$-Verbrauch, sind die ADP/O-Werte ebenfalls erhöht. Diese zwar leichte, aber nach Einwirkung steigender Temperaturen in situ kontinuierliche Verbesserung der energetischen Kopplung der Mitochondrien wird durch Parallelversuche bestätigt.

Abb. 13 zeigt, daß - im Gegensatz zu den nach einer Hitzebehandlung in situ erzielten Resultaten - aus ungeschädigten Spinatblättern isolierte, in vitro erhitzte Mitochondrien und Thylakoide annähernd die gleiche Hitzeempfindlichkeit besitzen. Der Vergleich mit Abb. 12 ergibt, daß Mitochondrien durch den Verlust ihrer cytoplasmatischen Umgebung signifikant hitzelabiler geworden sind. Mitochondrien und Thylakoide weisen ein Inaktivierungsmuster auf, das dem der Thylakoide nach Erhitzen in situ (Abb. 12) ähnelt. Bei beiden Biomembransystemen werden mit steigender Temperatur sowohl der Elektronentransport als auch die Phosphorylierung gehemmt, letztere allerdings in einem etwas größeren Maße. Folglich werden die ADP/O-Werte ebenfalls erniedrigt, d.h. es tritt eine Entkopplung ein. Die Abnahme sowohl der RC- als auch der PC-Werte ist eher auf eine Senkung der Elektronentransportrate in state 3 als auf deren relativen Anstieg in state 4 zurückzuführen.

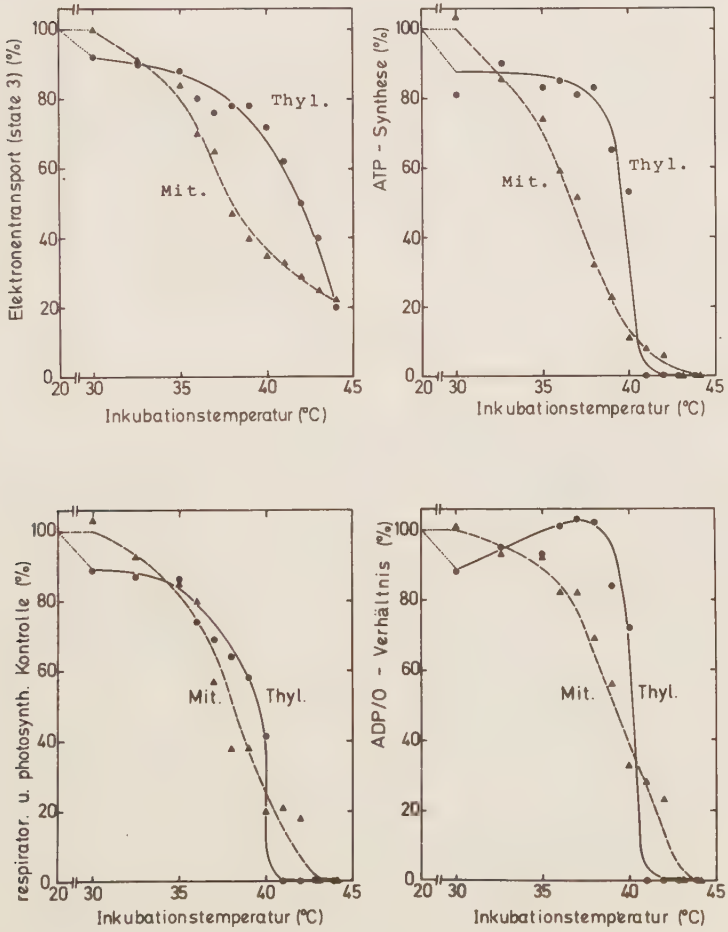
Beide Biomembransysteme weisen nach Erhitzen in vitro einige Unterschiede bezüglich des Verlaufs und Ausmaßes der Inaktivierung auf. Während die Aktivität der Mitochondrien bereits bei Temperaturen oberhalb 30°C allmählich abnimmt, brechen ATP-Synthese, photosynthetische Kontrolle und die im ADP/O-Verhältnis zum Ausdruck kommende energetische Kopplung der Thylakoide in einem engen Temperaturbereich um 40°C zusammen. Der ET hingegen erfährt auch eine allmähliche Hemmung. Eine vollständige Inaktivierung ist in beiden Biomembransystemen bei Temperaturen zwischen 40 und 45°C erreicht.

Abb. 12 Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden, die aus hitzebehandelten Blättern isoliert worden sind




Legende: s.S. 50

Abb. 13 Aktivität von Mitochondrien und Thylakoiden nach Hitzebehandlung in vitro




Legende: s.S. 50

Legende zu Abb. 12:

Die Aktivität ist als Funktion der Temperatur angegeben, bei der die Blätter vor der simultanen Isolierung der Membranen 6 min lang inkubiert wurden. Details zur Hitzebehandlung: siehe 2.2.2.

Aktivität der Kontrollen, welche 6 min bei 20°C inkubiert worden sind (= 100 %):

Mitochondrien: 26 (72) nmol $O_2$ (ATP) / mg Mitochondrienprotein x min; RC 2,61; ADP/O 1,40 (Malat + Glutamat)

Thylakoide: 70 (129) µmol $O_2$ (ATP) / mg Chl x h; PC 3,14; ADP/O 0,94 (Methylviologen)

- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Legende zu Abb. 13:

Die Aktivität ist als Funktion der Temperatur angegeben, bei der die aus ungeschädigten Spinatblättern simultan isolierten, jeweils in Waschmedium mit 0,3 M Mannit als Osmotikum (2.3.1.) suspendierten Membranen 3 min lang inkubiert wurden.

Aktivität der Kontrollen (= 100 %):

Mitochondrien: 25 (72) nmol $O_2$ (ATP) / mg Mitochondrienprotein x min; RC 2,22; ADP/O 1,42 (Malat + Glutamat)

Thylakoide: 50 (89) µmol $O_2$ (ATP) / mg Chl x h; PC 2,11; ADP/O 0,92 (Methylviologen)

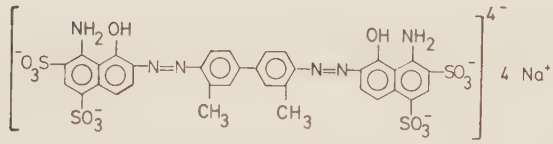
### 3.2.3. Hitzeeinwirkung auf Tonoplast und Plasmalemma isolierter Protoplasten

Es stellt sich die Frage, ob die Hitzeinaktivierung der Photosynthese eventuell ein sekundärer Schaden ist, dessen primäre Ursache in einer anderweitigen Schädigung der Pflanzenzelle bestehen könnte. So könnte die Thermolabilität der Photosynthese bzw. energiekonservierender Reaktionen allgemein mit dem Verlust der Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma, d.h. mit einem generellen Zusammenbruch der Zellkompartimentierung korreliert sein. Um dies zu untersuchen, wurden an hitzebehandelten isolierten Protoplasten sowohl Atmungs- und Photosyntheseaktivität als auch Permeabilitätsveränderungen der beiden letztgenannten Membranen bestimmt.

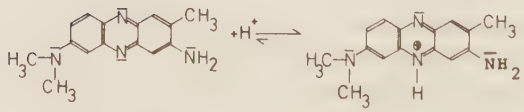
Zur Charakterisierung der Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma wurden verschiedene Methoden angewendet.

1.) Zum einen wurde die Permeabilität für Evan's Blau bzw. Neutralrot (Abb.) auf lichtmikroskopischem Wege ermittelt. Zellen bzw. Protoplasten mit intaktem Plasmalemma sind in der Lage, Evan's Blau auszuschließen (Gaff und Okong'o-Ogola, 1971; Ruesink, 1980). Wenigstens zwei der vier reaktiven Sulfonsäuregruppen dieses sauren Azofarbstoffs dürften bei physiologischem pH dissoziiert vorliegen, so daß das Molekül nach außen geladen ist und - abgesehen von seiner Größe (MG 960) - aufgrund der Semipermeabilität des Plasmalemmas nicht in die Protoplasten eindringen kann.
Die Fähigkeit der Vakuolen, Neutralrot zu akkumulieren, dient als Maß für die Intaktheit des Tonoplasten (Levitt, 1974). Dieser basische Indikatorfarbstoff (pk 6,8; MG 289) permeiert Plasmalemma und Tonoplast als ungeladenes Molekül. Eine Voraussetzung hierfür ist, daß der pH des die Protoplasten umgebenden Mediums nicht zu niedrig ist, da dann der Farbstoff außen bereits überwiegend in protonierter Form vorliegt (Levitt, 1974 und eigene Beobachtung). Dies ist bei pH 7,6 (2.7.1.) nicht der Fall. In der Vakuole wird

der Farbstoff aufgrund des dort niedrigeren pH-Werts protoniert. Als (weinrot gefärbtes) Kation kann Neutralrot den Tonoplasten nicht permeieren und wird deshalb in der Vakuole angehäuft. Ein Intaktheitsverlust des Tonoplasten allein würde, falls das Plasmalemma gleichzeitig seine selektiven Permeabilitätseigenschaften behält, in einer Überflutung des Cytoplasmas mit sauren Vakuolenbestandteilen und folglich einer Rotfärbung der gesamten Zelle resultieren. Zwar konnten neben Zellen mit rotgefärbten bzw. farblosen Vakuolen und diesen umgebendem Cytoplasma, welches die grünen Chloroplasten enthielt, vereinzelt rotbraun gefärbte Aggregate von Protoplastengröße beobachtet werden. Diese waren jedoch im allgemeinen nicht von abgerundeter, sondern von unregelmäßiger Gestalt und stellten offensichtlich keine intakten Protoplasten dar. Deshalb wurden sie nicht in die Auswertung einbezogen.



EVAN's BLAU



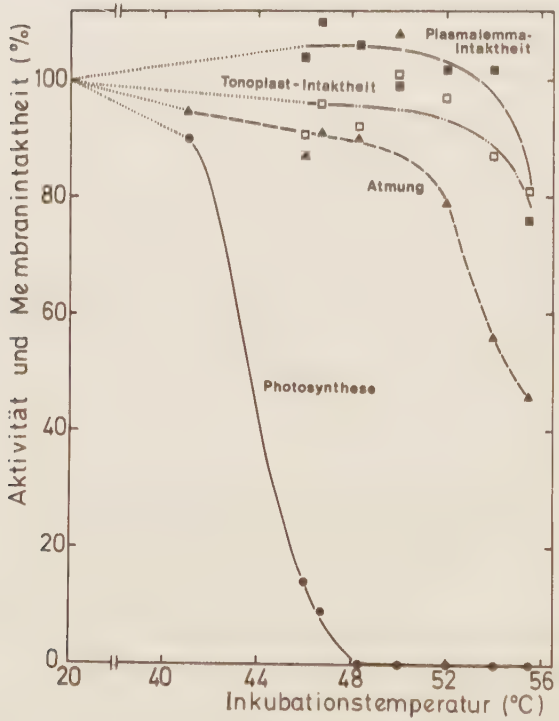
NEUTRALROT

Der Vorteil der obengenannten Färbemethoden liegt darin, daß man die Intaktheit sowohl des Tonoplasten als auch des Plasmalemmas ermitteln kann. Der Nachteil ist in der zeitaufwendigen Auswertung der Protoplasten unter dem Phasenkontrastmikroskop zu sehen, da zur Absicherung der Daten sehr viele Protoplasten ausgezählt werden müssen. Spektralphotometrische Untersuchungen der Kinetik der Neutralrotakkumulation wurden hier nicht durchgeführt, weil diese selbst bei isolierten Vakuolen große Streuungen ergaben (Weigel, persönl. Mitteilung) und bei Protoplasten aufgrund des Vorhandenseins der übrigen Zellbestandteile mit noch größerer Ungenauigkeit behaftet wären.

2.) Zum andern wurde der Ionenefflux aus hitzebehandelten Protoplasten über die Messung der Leitfähigkeit bzw. des $K^+$- und $Cl^-$-Gehalts im Überstand der nach einer Hitzebehandlung abzentrifugierten Protoplasten ermittelt. Der Vorteil dieser Methode liegt im geringeren Zeitaufwand. Der Nachteil ist darin zu sehen, daß keine exakte Aussage über den Tonoplasten möglich ist (vgl. S. 56).

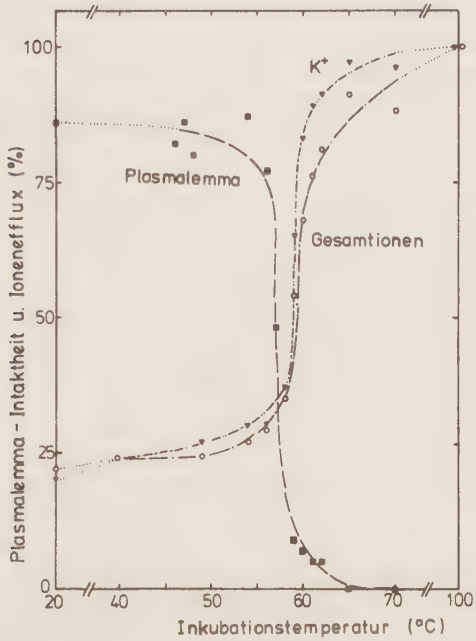
Die Ergebnisse sind in Abb. 14-15 und Tab. III dargestellt. Abb. 14 zeigt, daß die Photosynthese und auch die Atmung schon deutlich inaktiviert worden sind, bevor drastische Änderungen in der Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma eintreten. Bei einer Temperatur, die zu einer vollständigen Inaktivierung der Netto-Photosynthese führt, finden der Ausschluß von Evan'n Blau aus den Protoplasten und die Akkumulation von Neutralrot in deren Vakuolen noch im selben Ausmaß statt wie bei den nichterhitzten Kontrollen. Selbst eine stärkere Erhitzung der Protoplasten (3 min bei 55,5°C), die zu einer 50 % Hemmung der Atmung führt, verursacht nur geringfügige Änderungen in der Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma. Nach einer dreiminütigen Thermobehandlung bei 70°C werden hingegen alle Protoplasten mit Evan's Blau gefärbt, bzw. in deren Vakuolen tritt keine Neutralrotakkumulation mehr ein.

Abb. 14 Atmung, Photosynthese, Tonoplast- und Plasmalemma-Intaktheit von hitzebehandelten isolierten Feldsalat-Protoplasten




Die Aktivität ist als Funktion der Temperatur angegeben, bei der die Protoplasten 3 min lang inkubiert wurden. Die Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma wurde anhand der Akkumulation von Neutralrot in der Vakuole bzw. des Ausschlusses von Evan's Blau aus den Protoplasten ermittelt (2.7.1.).
Werte der Kontrollen, welche 3 min bei 20°C inkubiert worden sind (= 100 %):
Photosynthese (Atmung) 90,4 (5,5) µmol $O_2$/mg Chl x h;
Tonoplast-Intaktheit: 91 %; Plasmalemma-Intaktheit: 78 %

Abb. 15 Plasmalemma-Intaktheit und Ionenefflux nach Hitzebehandlung isolierter Feldsalat-Protoplasten




Nach 3 min Inkubation der Protoplasten bei der angegebenen Temperatur wurden die Plasmalemma-Intaktheit mit Hilfe von Evan's Blau (2.7.1.), der Gesamtionenefflux (konduktometrisch) und der $K^+$-Efflux (flammenphotometrisch) (2.7.2.) bestimmt.
Der Ionenefflux aus Protoplasten, die 3 min lang bei 100°C inkubiert worden waren, wurde = 100 % gesetzt. Dieser entspricht freien Ladungsträgern $\triangleq 8280/\mu S/cm$ x mg Chl bzw. $76/\mu eq\ K^+/mg$ Chl.

Theoretisch ist nicht auszuschließen, daß hitzeinduzierte Leckflüsse kleinerer Ionen aus den Protoplasten schon bei niedrigeren Temperaturen als solchen erfolgen, welche eine Permeabilitätsveränderung für das große Ion Evan's Blau (s.o.) hervorrufen. Aus Abb. 15 ist hingegen ersichtlich, daß ein drastischer Verlust der Plasmalemma-Intaktheit, sowohl anhand des Eindringens von Evan's Blau in die Protoplasten als auch durch Messung des Ioneneffluxes bestimmt, erst bei Temperaturen zwischen 58 und 61°C eintritt. Der $K^+$- bzw. $Cl^-$- (Tab. III) Efflux findet im selben Temperaturbereich statt wie der in der Leitfähigkeitserhöhung zum Ausdruck kommende Gesamtionenefflux. Letzterer ist nicht in µeq anzugeben, da eine Eichung des Konduktometers mit einer KCl-Lösung durchgeführt wurde, die Leitfähigkeit bei gleichen Konzentrationen verschiedener Elektrolyte aber unterschiedlich hohe Werte annimmt. Die Tatsache, daß der Ioneneffluß aus den bei 100°C erhitzten Protoplasten höher liegt als nach einer Temperaturbehandlung bei 70°C, dürfte auf eine Abdissoziation von Ladungsträgern zurückzuführen sein, welche zuvor an Makromoleküle gebunden waren.

Streng genommen läßt sich aus dem Ioneneffluß aus den Protoplasten ein Semipermeabilitätsverlust lediglich des Plasmalemmas ersehen. Da die Vakuole jedoch im allgemeinen mindestens 90 % des Zellvolumens einnimmt, dürfte ein Ioneneffluß, der denjenigen der nichterhitzten Kontrollen um mehr als 10 % übersteigt, auf einen Leckfluß aus der Vakuole zurückzuführen sein und somit zumindest indirekt einen Permeabilitätsanstieg des Tonoplasten widerspiegeln. Die Ionen, welche nach Einwirkung von Temperaturen zwischen 40 und 50°C aus den Protoplasten in das umgebende Medium verlorengehen und weniger als 10 % des Gesamtioneneffluxes ausmachen, könnten theoretisch sowohl aus der Vakuole als auch aus dem Cytoplasma stammen; zwischen beiden Möglichkeiten kann jedoch nicht differenziert werden (vgl. hierzu die Diskussion, 4.2.3.).

Tabelle III Chloridefflux nach Hitzebehandlung isolierter Feldsalat-Protoplasten

| Temperatur (°C) | $Cl^-$-Efflux (%) |
|---|---|
| 20 | 38 |
| 40 | 40 |
| 50 | 45 |
| 58 | 52 |
| → 59 | → 82 |
| 60 | 85 |
| 100 | 100 |

Die Protoplasten wurden 3 min lang bei der angegebenen Temperatur inkubiert.

100 % Efflux ≙ 12,1 ueq/mg Chl

# 4. DISKUSSION

## 4.1.Gefrieren

### 4.1.1. Gefrieren isolierter Mitochondrien und Thylakoide

Sowohl Mitochondrien als auch Thylakoide erfahren durch Gefrieren in vitro in Abwesenheit ausreichender Schutzstoffmengen eine deutliche Schädigung (Tab. I, Abb. 1-5). Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres Inaktivierungsmusters.

Bei Thylakoiden tritt eine irreversible Entkopplung ein, die sich in einer starken Stimulation des Elektronentransports bei gleichzeitiger Inaktivierung der Photophosphorylierung äußert (Tab. I, Abb. 1-2, 4-5). Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein (siehe z.B. Heber und Santarius, 1964; Volger et al., 1978; Jensen, 1981). Wodurch wird diese Entkopplung nun verursacht?

Der Zusammenbruch der Photophosphorylierung ist auf eine Erhöhung der Protonendurchlässigkeit der Membran zurückzuführen (Heber, 1967; Garber und Steponkus, 1976; Jensen, 1981). Folglich kann der lichtinduzierte Protonengradient nicht mehr aufgebaut werden, der nach Mitchell's chemiosmotischer Theorie die treibende Kraft der Phosphorylierung darstellt (Mitchell, 1966). Ein vermehrter Protonenleckfluß aus den Thylakoiden dürfte auch die Ursache der frostinduzierten Stimulation des photosynthetischen Elektronentransports darstellen. Dessen Geschwindigkeit wird unmittelbar über die Protonenkonzentration im Thylakoidinnenraum reguliert: der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Reoxidation des zwischen Photosystem II und I gelegenen Plastochinons, welche durch einen zu niedrigen pH im Thylakoidinnenraum gehemmt wird (Siggel, 1975). Folglich wird bei einer Erhöhung des Innen-pH durch Senkung des Protonengradienten, welche in begrenztem Umfang durch Schaffung phosphorylierender

Bedingungen (Shavit, 1980) und in verstärktem Ausmaß durch Entkopplung hervorgerufen wird (vgl. Abb. 3), der Elektronentransport beschleunigt. In diesem Sinne ist die Erniedrigung der photosynthetischen Kontrolle (PC-Werte) nach Gefrieren in vitro in Abwesenheit ausreichender Schutzstoffmengen ebenso ein Zeichen erhöhter $H^+$-Durchlässigkeit der Thylakoidmembran: eine Verlangsamung des ET in state 4 (vgl. 3.1.1. S. 20) kann hier nicht beobachtet werden. Sie würde nach Mitchell (1966) dadurch hervorgerufen, daß der Protonengradient, welcher sich über der Membran aufbaut, nach Erschöpfung des Phosphatakzeptors wieder größer wird, so daß ein Rückstau des Elektronenflusses entsteht.

Eine Frostbehandlung isolierter Thylakoide führt auch zu einer Abdissoziation des Kopplungsfaktors $CF_1$ von den Membranen (Garber und Steponkus, 1976; Volger et al., 1978). Da durch dessen Ablösung ein spezifischer Protonenkanal im in die Thylakoidmembran integrierten $CF_o$-Komplex der Chloroplasten-ATPase geöffnet wird (vgl. z.B. Hesse et al., 1976; Strotmann und Schumann, 1983), könnte die erhöhte $H^+$-Permeabilität der photosynthetischen Membran und die hieraus resultierende Entkopplung nach Gefrieren in vitro durch die Freisetzung von $CF_1$ hervorgerufen werden. Obwohl frostbehandelte Thylakoide einen signifikanten Proteinverlust erst aufweisen, nachdem die Phosphorylierung längst inaktiviert worden ist (Volger et al., 1978), ist nicht auszuschließen, daß die gefrierinduzierte Ablösung von nur wenigen Kopplungsfaktoren schon für eine weitgehende Zerstörung des Protonengradienten und damit für den Verlust der Fähigkeit zur ATP-Synthese ausreicht. Dafür sprechen Befunde von Hesse et al. (1976), nach denen vollständige Entkopplung bereits eintritt, wenn erst 50 % des $CF_1$ - in diesem Fall durch extreme Erniedrigung der Kationenkonzentration - von den Thylakoiden abgelöst worden sind (vgl. auch Strotmann et al., 1973). Da die Bindung des $CF_1$ an die Thylakoidmembran unspezifisch über Metallionen erfolgt (Avron, 1963 zitiert aus Hesse et al., 1976), wirken diese in geringen Konzentrationen stabilisierend. So hohe Salzkonzentrationen, welche nach Frosteinwirkung in vitro unter den hier ge-

wählten Bedingungen in der ungefrorenen Restlösung eintreten können, rufen hingegen eine Abdissoziation peripherer Proteine wie des $CF_1$ hervor (vgl. weiter unten). Als primäre Ursache der Ablösung von Membranproteinen nach Gefrieren in Gegenwart von Salzen dürfte Mollenhauer et al. (1983) zufolge die Unterdrückung der elektrostatischen Bindungskräfte innerhalb der Membran in Frage kommen.

Im Gegensatz zu den Thylakoiden resultiert eine Gefrierbehandlung isolierter Mitochondrien nicht in einer Beschleunigung, sondern in einer Hemmung des Elektronentransports (Tab. I, Abb. 1). Wodurch könnte diese Hemmung hervorgerufen werden?

Über eine gefrierinduzierte Inhibierung des Transports von Substrat, ADP und $P_i$ in pflanzliche Mitochondrien ist bisher nichts bekannt. Der Transport vieler Atmungssubstrate wie z.B. Malat erfolgt über energieabhängige Carriermechanismen (vgl. Day und Hanson, 1977); deshalb dürfte dessen Hemmung ein Sekundäreffekt der Hemmung des Elektronentransports sein. Ebenso wie viele lösliche Enzyme eine relativ hohe Stabilität gegenüber Gefrieren aufweisen (Ullrich und Heber, 1961; Heber, 1968; Santarius, 1969; Levitt, 1980), ist auch eine direkte Frostschädigung von löslichen Matrix-Dehydrogenasen pflanzlicher Mitochondrien noch nicht nachgewiesen worden. Es ist jedoch denkbar, daß die während des Gefrierens einsetzende Konzentrationserhöhung anorganischer Elektrolyte eine Inaktivierung von Enzymen des Citratzyklus bewirken kann (vgl. das weiter unten über die Wirkung hoher Salzkonzentrationen gesagte). Schließlich könnte die gefrierinduzierte Hemmung des $O_2$-Verbrauchs durch eine funktionelle und/oder strukturelle Desorganisation der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Elektronentransportkette selbst hervorgerufen werden. Welche Stelle hierin besonders frostempfindlich sein könnte, ist noch nicht geklärt.

Eine Gefrierbehandlung isolierter Mitochondrien in Gegenwart von Salzen resultiert auch in einer Hemmung der ATP-Synthese und einer Erniedrigung der ADP/O-Werte. Hierfür könnte zum einen

eine Stimulation der $F_1$-ATPase-Aktivität, also der ATP-Hydrolyse, durch $Na^+$ (Silva-Lima und Peter, 1980) verantwortlich sein, welches die innere Membran pflanzlicher Mitochondrien leicht permeiert (ibid.; vgl. weiter unten) und - zumindest während der Frosteinwirkung - dann auch in der Matrix in höherer Konzentration vorliegen dürfte. Ob die gefrierinduzierte Inaktivierung der oxidativen Phosphorylierung ähnlich, wie für Thylakoide angenommen wird, auf eine $H^+$-Permeabilitätserhöhung zurückzuführen ist, welche durch die Ablösung des Kopplungsfaktors von den Membranen hervorgerufen wird (s.o.), ist fraglich. Zwar wurde eine Kältelabilität der isolierten $F_1$-ATPase tierischer Mitochondrien nachgewiesen (Penefsky und Warner, 1965), welche durch Einwirkung tiefer Temperaturen in Untereinheiten dissoziiert und somit ihre Funktion einbüßt. Ob dies auch der Fall ist, wenn das Enzym in membrangebundenem Zustand vorliegt, ist hingegen nicht bekannt. Die frostinduzierte Freisetzung des Matrixenzyms Fumarat-Hydratase aus pflanzlichen Mitochondrien (Thebud und Santarius, 1981) weist zumindest darauf hin, daß Gefrieren unspezifische Permeabilitätsveränderungen ihrer inneren Membran hervorrufen kann. Bei tierischen Mitochondrien ist auch ein Anstieg der Protonenpermeabilität nach einer Gefrierbehandlung in vitro nachgewiesen worden. Er geht jedoch mit einer Beschleunigung des state-4-ET einher (Petrenko et al., 1982), die an frostbehandelten Spinatblattmitochondrien hingegen nicht zu beobachten ist. Vielmehr wird die Senkung der respiratorischen Kontrolle (RC-Werte) (Tab. I, Abb. 1) durch eine Verlangsamung des ET in state 3 verursacht und ist somit nicht notwendigerweise auf $H^+$-Leckflüsse zurückzuführen. Die im Vergleich zu Thylakoiden geringere Empfindlichkeit der ATP-Synthese der Mitochondrien nach Gefrieren in vitro könnte evtl. darauf beruhen, daß der auf der Innenseite der inneren Membran lokalisierte Kopplungsfaktor weniger leicht abdissoziieren kann.

Der Elektronentransport von Thylakoiden und Mitochondrien wird mit Ausnahme des entkoppelten ET der Thylakoide durch Einwirkung hoher Salzkonzentrationen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts in ähnlicher Weise beeinflußt wie durch Gefrieren in Gegenwart von NaCl (Tab. II, Abb. 6). Somit dürfte der Anstieg

der Konzentration an anorganischen Elektrolyten in der ungefrorenen Restlösung als eine Ursache für die Gefrierinaktivierung dieser Biomembransysteme in Frage kommen (Lovelock, 1953; vgl. Heber und Santarius, 1973; Heber et al., 1979). Wieso kann nun die Erhöhung der Salzkonzentration den basalen und gekoppelten ET der Thylakoide stimulieren, den basalen, gekoppelten und entkoppelten ET der Mitochondrien hingegen hemmen?

Nicht nur Gefrieren, sondern auch die Einwirkung hoher Elektrolytkonzentrationen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts führt zu einer Freisetzung von Membranproteinen (Volger et al., 1978; Heber et al., 1981), unter andern des Kopplungsfaktors $CF_1$ (Nelson, 1980). Dessen Ablösung wird als Ursache der erhöhten Protonenpermeabilität der Membran angesehen, die in einer Beschleunigung des basalen und des state 3-ET resultiert (vgl. S. 58, 59). Hohe Salzkonzentrationen dürften vor allem extrinsische Membranproteine beeinflussen, indem ein Überangebot an Salzionen eine Verringerung der ionischen Wechselwirkungen zwischen polaren Bindungsstellen der Membran und geladenen Gruppen der Proteine bewirken kann, was letztendlich in deren Ablösung von der Membran resultiert (Volger et al., 1978; Heber et al., 1979; vgl. auch Volger und Santarius, 1981, S. 199).

Über die Wirkung von Salzen auf pflanzliche Mitochondrien ist wenig bekannt. Einerseits benötigen isolierte Mitochondrien zur Aufrechterhaltung ihrer funktionellen Intaktheit ein gewisses Angebot an Kationen im Medium. Dies hat zwei Ursachen. Parallel zum Protonenefflux, welcher durch den Elektronentransport hervorgerufen wird, muß zur Wahrung der Elektroneutralität ein entsprechender Influx von Kationen stattfinden (Hanson und Day, 1980). Ferner dienen sie der Abschirmung fixierter negativer Ladungen der inneren Mitochondrienmembran und verhindern somit eine elektrostatische Abstoßung der im allgemeinen negativ geladenen Atmungssubstrate, welche in die Matrix transportiert werden müssen (Palmer und Møller, 1982). Andererseits werden lösliche Matrixenzyme wie die Fumarat-Hydratase (Kaiser,

persönliche Mitteilung) und die Malat-Dehydrogenase (Kalir und Poljakoff-Mayber, 1975) durch hohe Salzkonzentrationen inaktiviert. Da NaCl die innere Membran pflanzlicher Mitochondrien leicht permeieren kann (Silva-Lima und Peter, 1980), könnte ein Überangebot an Salzen im Außenmedium über eine Hemmung von Matrixenzymen dazu führen, daß weniger Reduktionsäquivalente für den Elektronentransport bereitgestellt werden. Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß hohe Salzkonzentrationen einen direkten Effekt auf die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Elektronentransportkette ausüben. Dafür spricht die Hemmung der fest in die innere Membran integrierten Succinat-Dehydrogenase durch Einwirkung hoher Elektrolytkonzentrationen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts (Thebud, 1979).

Der entkoppelte ET der Thylakoide erfährt durch Einwirkung erhöhter Ionenkonzentrationen bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts eine Hemmung (Abb. 6c, 7, 8), während er bei gleicher Inkubationsdauer nach Gefrieren in Gegenwart von NaCl, welches in der ungefrorenen Restlösung eine weit höhere Konzentration als 2 M erreicht, unbeeinflußt ist (Abb. 6c). Wieso können nun bei höherer Temperatur niedrigere Salzkonzentrationen stärker schädigen?

Es ist bekannt, daß eine Temperaturerhöhung einen Anstieg der kinetischen Energie der Moleküle zur Folge hat. Dementsprechend können mehr Ionen pro Zeiteinheit mit den empfindlichen Stellen der Membran in Wechselwirkung treten. Dies mag die Ursache dafür sein, daß bei einer gegebenen hohen Salzkonzentration mit steigender Temperatur eine größere Menge an Proteinen von den Membranen abgelöst wird (Heber et al., 1981). Ferner wird nach Einwirkung einer konstant hohen NaCl-Konzentration (1 M) der entkoppelte ET der Thylakoide bei höherer Temperatur in steigendem Ausmaß gehemmt (Abb. 8). Diese Befunde könnten dahingehend interpretiert werden, daß eine mit steigender Temperatur zunehmende Proteinablösung von der Membran Lecks erzeugen kann. Durch diese könnten Ionen, welche außen in hoher Konzentration vor-

liegen, vermehrt in die Thylakoidmembran bzw. deren Innenraum eindringen und somit auch die in der Membran inkorporierte Elektronentransportkette direkt schädigen. Letzteres ist nach Gefrieren zumindest unter den hier gewählten Bedingungen offensichtlich nicht der Fall.
Die bisherigen Resultate über die Permeabilität der Thylakoidmembran für NaCl sind widersprüchlich. Williams und Meryman (1970) schlossen aus Volumenmessungen an Thylakoiden, daß NaCl zwar nach längerer Einwirkungsdauer bei 0°C, aber nicht beim Gefrieren in deren Innenraum eindringen kann. Untersuchungen von Jensen (1981) zufolge dürfte NaCl beim Gefrieren die Thylakoidmembran permeieren. Dies geschieht möglicherweise jedoch nur zu einem geringen Ausmaß, da die Thylakoide durch den bei der Eisbildung einsetzenden Wasserentzug so schnell schrumpfen dürften, daß den Ionen wenig Zeit verbleibt, in die Membranen einzudringen. Eventuell kommt eine Gefrierschädigung der Thylakoide in Gegenwart von Salzen bereits dadurch zustande, daß diese während der Eisbildung auf der Membranaußenseite konzentriert werden.

Auf welche physikochemischen Ursachen ist die Membraninaktivierung durch hohe Salzkonzentrationen zurückzuführen?
Die Destabilisierung von Biomembranen durch Einwirkung höherer Elektrolytkonzentrationen während des Gefrierens oder bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts kann zum einen durch den Entzug oder die Desorientierung ihres Strukturwassers hervorgerufen werden (Santarius, 1969). Ferner können die Ionen der Außenlösung elektrostatische Wechselwirkungen innerhalb der Membran unterdrücken, indem sie mit geladenen oder polaren Gruppen der Membranproteine um Bindungsstellen innerhalb der Membran konkurrieren. Dies ist umso eher möglich, je stärker sich die Ionen der Außenlösung den polaren Membranstellen nähern können, weshalb ihre schädigende Wirkung mit abnehmendem hydratisierten Radius ansteigt (Santarius, 1969; Heber et al., 1979).

Wenngleich die Konzentrierung von Elektrolyten in der ungefrorenen Restlösung während des Gefriervorgangs eine wesentliche Ursache der Membranschädigung darstellt, wird das Ausmaß der

Inaktivierung nach Gefrieren in vitro noch durch andere Faktoren beeinflußt. Dazu gehören die durch den Wasserverlust hervorgerufene Reduktion des Partikelvolumens ("minimum-volume-Hypothese", Meryman, 1970; Williams und Shaw, 1980) sowie der Oberfläche der Membran (Wiest und Steponkus, 1978; Williams et al., 1981), welche durch den Wassereinstrom während des Tauens expandiert und schließlich platzt (vgl. Einleitung). Weiterhin sind die Gefriertemperatur, die Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit, die Gefrierdauer, das Volumen der ungefrorenen Restlösung, welches auf die Packungsdichte der Membranen während des Gefrierens von Einfluß ist, die Wahl der Isolationsmethode (Abb. 2) sowie die Anwesenheit von Schutzstoffen (Abb. 1,2,5) für das Schadensausmaß von Bedeutung (siehe z.B. Santarius und Heber, 1970; Heber und Santarius, 1973; Garber und Steponkus, 1976; Lineberger und Steponkus, 1980; Santarius und Giersch, 1983; und andere).

### 4.1.2. Gefrieren ganzer Blätter

Früheren Untersuchungen zufolge weisen aus gefrorenen und wieder aufgetauten Blättern isolierte Thylakoide ein Inaktivierungsmuster auf, welches sich deutlich von dem in vitro gefrorener Membranen unterscheidet (siehe Einleitung). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt (vgl. Tab. I, Abb. 1-4 und 6 mit Abb. 9). Nach einer Gefrierbehandlung von Thylakoiden in situ tritt eine deutliche Hemmung des Elektronentransports ein (Abb. 9; vgl. Heber et al., 1973; Klosson und Krause, 1981; Krause et al., 1982). Die Inaktivierung der Photophosphorylierung erfolgt parallel zu dieser Hemmung, wohingegen die energetische Kopplung, die in den ADP/O-Werten zum Ausdruck kommt, erst bei Thylakoiden zusammenbricht, welche aus stark frostgeschädigten, nach dem Tauen völlig wasserinfiltrierten Blättern isoliert worden sind. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Krause et al. (1982) überein.

Auf welche Faktoren könnte die Inaktivierung der Thylakoide nach Gefrieren in situ zurückzuführen sein?
Während die Rate der lichtinduzierten Protonenaufnahme parallel zur Hemmung der Photophosphorylierung und des Elektronentransports erniedrigt wird, erfolgt nur eine geringfügige Senkung des $\Delta$ pH (Klosson und Krause, 1981; Krause et al., 1982). Dies bedeutet, daß eine Frostbehandlung in situ nicht zu einer Erhöhung der Protonendurchlässigkeit der Membran führt, welche nach Gefrieren isolierter Thylakoide in Gegenwart von Salzen eintritt (siehe 4.1.1. S. 58). Daraus kann man schließen, daß die Inaktivierung von Thylakoiden nach Gefrieren ganzer Blätter nicht primär durch die schädigende Wirkung steigender Konzentrationen anorganischer Elektrolyte während der extrazellulären Eisbildung verursacht werden dürfte. Ebensowenig dürften semipolare Verbindungen, welche zwar zu einer Hemmung des Elektronentransports (Heber et al., 1973; 1979), aber gleichzeitig auch zu einer Erhöhung der $H^+$-Permeabilität der Thylakoidmembran und folglich zur Entkopplung der Photophosphorylierung führen (Krause et al., 1982), für die Inaktivierung der Thylakoide nach Gefrieren in situ verantwortlich sein. Die Natur der Frostschädigung von Thylakoiden in situ bedarf deshalb noch einer genauen Klärung. Möglicherweise befinden sich in vivo in der Nähe der Membranen bestimmte Schutzstoffe, welche eine Entkopplung, wie sie nach einer Gefrierbehandlung isolierter Thylakoide erfolgt (Tab. I, Abb. 1-4,6), verhindern können.

Im Gegensatz zu Thylakoiden weisen aus frostbehandelten Blättern isolierte Mitochondrien das gleiche Inaktivierungsmuster auf wie nach Gefrieren in Gegenwart von NaCl (vgl. Abb. 1 mit Abb. 9). Dies läßt vermuten, daß eine Schädigung dieser Membranen auch in vivo auf eine Konzentrationserhöhung anorganischer Elektrolyte in der ungefrorenen Restlösung zurückzuführen sein könnte. Nach Gefrieren der Blätter bei -7 bis -9°C (Abb. 9) dürfte in diesen allerdings eine wesentlich niedrigere Konzentration an schädigenden Elektrolyten erreicht werden als in der Umgebung isolierter Mitochondrien, welche in einem Medium mit NaCl als Osmotikum bei -20 bis -25°C gefroren worden sind (Tab. I, Abb. 1).

Es zeigt sich jedoch, daß Mitochondrien bereits durch Einwirkung einer NaCl-Konzentration, welche die beim Gefrieren der Membranen in der ungefrorenen Restlösung erreichte bei weitem unterschreitet, deutlich geschädigt werden (Abb. 6; vgl. 3.1.2., S. 31).

Wenn auch die Inaktivierung von Thylakoiden und Mitochondrien nach Gefrieren in situ möglicherweise auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein könnte, so erfolgt eine Manifestation des Frostschadens in beiden Biomembransystemen auf ähnliche Weise. Die Depression der photosynthetischen und respiratorischen Kontrolle bei Thylakoiden und Mitochondrien, welche aus partiell frostgeschädigten Blättern isoliert worden sind (Abb. 9), wird primär durch eine Hemmung des state 3 - ET verursacht. Die andere Möglichkeit, durch die eine Erniedrigung der PC- und RC-Werte zustandekommen kann - ein beschleunigter state 4 - ET - würde nach Mitchell (1966) auf einer Erniedrigung des Protonengradienten beruhen, welche durch verstärkte $H^+$-Leckflüsse hervorgerufen wird. Eine Frostbehandlung von Thylakoiden in situ führt jedoch nicht zu einer Erhöhung der Protonenpermeabilität (s.o.). Ebensowenig konnte ein relativer Anstieg des state 4 - ET bei Thylakoiden und Mitochondrien beobachtet werden. Daraus kann man schließen, daß die Inaktivierung beider Biomembransysteme nach Gefrieren in vivo primär durch eine Inhibierung des Elektronentransports zustandekommt. Dies wird durch Untersuchungen von Krause et al. (1982) bestätigt. Nach Gefrieren in situ bricht der mit 5 mM $NH_4Cl$ entkoppelte ET der Thylakoide im selben Temperaturbereich zusammen wie der in Gegenwart von ADP gemessene gekoppelte ET. Wäre dessen frostinduzierte Hemmung lediglich die Folge einer Hemmung der ATP-Synthese und des daraus resultierenden Rückstaus des Protonengradienten, so hätte eine Inaktivierung des entkoppelten, d.h. mit maximaler Geschwindigkeit ablaufenden ET erst nach stärkerer Frosteinwirkung eintreten dürfen.

Nicht nur Thylakoide und Mitochondrien, sondern auch die Chloroplastenhüllmembran (Klosson, 1978; Klosson und Krause, 1981) werden durch Gefrieren in situ geschädigt. Ferner gibt es Hinweise darauf, daß ebenso das Plasmalemma (Palta und Li, 1978; 1980; Wiest und Steponkus, 1978; Singh, 1979) und der Tonoplast (Stout et al., 1980; Ziegler und Kandler, 1980; Ahrer-Steller, unveröffentlicht) frostempfindliche Orte der Pflanzenzelle darstellen. Der simultane Zusammenbruch der energiekonservierenden Reaktionen der Thylakoide und Mitochondrien nach Gefrieren in situ (Abb. 9) könnte daher möglicherweise auf einen generellen Zusammenbruch der Zellkompartimentierung zurückzuführen sein. Die Tatsache, daß Mitochondrien erst nach längerem Verweilen im Milieu der durch Frieren und Tauen abgetöteten Zellen geschädigt werden (Singh et al., 1977), unterstützt diese Annahme. Die Vermutung, daß die Inaktivierung von Thylakoiden nach Gefrieren in situ primär auf eine Überflutung der Zelle mit toxischen Vakuoleninhaltsstoffen zurückzuführen ist (Senser und Beck, 1977), konnte jedoch durch Experimente von Krause et al. (1982) nicht erhärtet werden. Daher kann man zur Zeit noch nicht entscheiden, welche Membran den primären Ort des Gefrierschadens in Blattzellen darstellt.

## 4.2. Hitze

### 4.2.1. Atmung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß durch kurzfristige Hitzebehandlung sowohl intakter Blätter (Abb. 10) als auch isolierter Protoplasten (Abb. 11, 14) die Netto-Photosynthese bereits bei Temperaturen inaktiviert wird, welche die endogene Atmung kaum beeinflussen. Dies stimmt mit früheren Untersuchugen überein (Langridge und McWilliam, 1967; Larcher, 1973; Alexandrov, 1977; und andere). Eine Inaktivierung der Atmung dürf-

te somit nicht als primäre Ursache der Hitzeschädigung von Blattzellen in Frage kommen. Eher erfährt die Dunkelatmung aufgrund ihres höheren Temperaturoptimums im Vergleich zur Photosynthese (Levitt, 1980) nach Einwirkung subletalen Hitzestresses eine Steigerung (Bauer, 1972; und andere). Diese kann sich zum einen schädlich auf die Pflanze auswirken, indem sie zu einer Verarmung an Reservestoffen und somit nach ausreichend langer Hitzedauer zum Verhungern führt (Levitt, 1980). Zum andern kann eine Beschleunigung der Atmung während bzw. nach der Einwirkung erhöhter Temperaturen für die Zelle nützlich sein. Wird z.B. die Steigerung der Dunkelatmung während des Erhitzens von Blättern durch Erhöhung der $CO_2$- oder Erniedrigung der $O_2$-Konzentration unterbunden, so erfolgt anschließend eine Inhibierung der photosynthetischen $CO_2$-Fixierung (Gale, 1982). Ferner ist bekannt, daß durch Erhöhung der mitochondriellen Atmungsaktivität nach Streßeinwirkung Reparationsprozesse ausgelöst werden können (siehe z.B. Romani und Yu, 1968). Dies könnte auch bei der Erholung von Hitzestress eine Rolle spielen. Die Tatsache, daß eine Hitzebehandlung intakter Blätter zu einer Erhöhung der Atmungsaktivität der Mitochondrien führt (Abb. 12), unterstützt diese Annahme.

Die unterschiedliche Thermosensitivität der Gesamtprozesse der Atmung und Photosynthese manifestiert sich in noch deutlicherem Maße in den energiekonservierenden Reaktionen der beteiligten Biomembransysteme, welche gleichzeitig in einem Präparationsgang aus hitzebehandelten Blättern isoliert worden sind. Nach der Einwirkung von Temperaturen, die zu einer weitgehenden Inaktivierung der photochemischen Reaktionen der Thylakoide führen, ist die energetische Kopplung der Mitochondrien nicht verschlechtert, sondern leicht stimuliert (Abb. 12). Offenbar wird durch eine Hitzebehandlung in situ der physiologische Zustand der inneren Mitochondrienmembran so verändert, daß der Elektronentransport mit erhöhter energetischer Wirksamkeit abläuft. Es ist bemerkenswert, daß diese Änderung zum einen selbst nach kurzfristiger Erhitzung erfolgt und zum andern sogar nach der Isolie-

rung und Aufbewahrung der Organellen bei 0°C anhält. Mehrere Möglichkeiten sind denkbar, welche zu einer Verbesserung der energetischen Kopplung nach Einwirkung erhöhter Temperaturen in situ führen könnten.

1.) Hitze könnte bei Spinatblattmitochondrien eine relative Senkung der cyanid- insensitiven Atmung bewirken, bei der die Elektronen nur die erste Kopplungsstelle durchlaufen, wobei maximal ADP/O-Werte von 1 erreicht werden können (Day et al., 1980), und somit zu einer Erhöhung des ADP/O-Verhältnisses beitragen.

2.) Pflanzliche Mitochondrien besitzen zwei NADH-Dehydrogenasen an der Matrixseite der inneren Membran, welche internes NADH oxidieren (Palmer und Møller, 1982). Beim Elektronentransport über die eine NADH-Dehydrogenase ergibt sich ein ADP/O-Verhältnis von 3, über die andere hingegen wird ein maximaler Wert von 2 erreicht. Hitze könnte nun eine relative Verstärkung des Elektronenflusses über die erstere Dehydrogenase bewirken.

Welche dieser Möglichkeiten für die Erhöhung der energetischen Kopplung der Mitochondrien nach Hitzeeinwirkung in situ verantwortlich sein könnte, bleibt offen.

Warum beeinflußt nun die Einwirkung erhöhter Temperaturen in der nativen cytoplasmatischen Umgebung Mitochondrien und Thylakoide unterschiedlich? Als eine Ursache könnte die verschiedene chemische Zusammensetzung der Biomembranen in Frage kommen. So enthalten z.B. pflanzliche Mitochondrienmembranen im Gegensatz zu Thylakoiden keine Galaktolipide (Hanson und Day, 1980), welche aufgrund ihrer OH-Gruppen vorzugsweise hydrophile Wechselwirkungen eingehen können. Die Bindungskräfte, welche die funktionelle Intaktheit der Membranen gewährleisten, sind möglicherweise unterschiedlich hitzeempfindlich: hydrophobe Kräfte werden mit steigenden Temperaturen verstärkt, hydrophile Wechselwirkungen hingegen abgeschwächt (Zitate siehe in Armond et al., 1980). Ferner könnte auch eine unterschiedliche strukturelle Anordnung der Lipide und Proteine zueinander für die verschiedene Thermosensitivität dieser Biomembranen verantwortlich sein.

Obengenannte Möglichkeiten dürften jedoch nur bedingt zutreffen, da aus ungeschädigten Blättern isolierte, in vitro erhitzte Mitochondrien im Vergleich zu ebenso behandelten Thylakoiden keine höhere Thermostabilität mehr aufweisen (Abb. 13). Hier wird die Aktivität der Mitochondrien im Gegensatz zur Hitzebehandlung in situ nicht stimuliert, sondern deutlich gehemmt; die Organellen sind durch den Verlust ihrer nativen cytoplasmatischen Umgebung signifikant hitzelabiler geworden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Es ist bekannt, daß die Einwirkung erhöhter Temperaturen auf isolierte Thylakoide zu einer Abdissoziation von Membranproteinen führt (Volger und Santarius, 1981). So könnten auch während einer Hitzebehandlung in vitro bestimmte Komponenten von der inneren Mitochondrienmembran abgelöst werden, wohingegen sie in der Zelle z.B. durch umgebende Proteine des Intermembranraums oder durch niedermolekulare Cytoplasmabestandteile, für die die äußere Mitochondrienmembran keine Permeabilitätsbarriere darstellt (Hanson und Day, 1980), geschützt werden könnten. Ferner könnte ebenso wie bei Thylakoiden (Santarius, 1973; Krause und Santarius, 1975; Weis, 1982a) das Ausmaß der Hitzeinaktivierung der Mitochondrien von der Art und Konzentration der gelösten Bestandteile des Mediums, in dem die Hitzebehandlung durchgeführt wird, abhängen. Eine Variation des Milieus kann eine Veränderung der Thermosensitivität pflanzlicher Mitochondrienenzyme bewirken (Nash et al., 1982). Da die mitochondrielle Malat-Dehydrogenase (Walk et al., 1977; Nash et al., 1982) sowie andere lösliche Enzyme (Santarius, 1975; Björkman et al., 1980) eine hohe Thermostabilität aufweisen, dürfte die Hitzeinaktivierung jedoch eher auf Veränderungen innerhalb der komplexen membrangebundenen Elektronentransportkette selbst zurückzuführen sein. Dies stimmt mit früheren Untersuchungen über die Wirkung von Hitze auf isolierte pflanzliche Mitochondrien verschiedenen Ursprungs überein (Dizengremel und Chauveau, 1978). Ebenso ist die Tatsache, daß Mitochondrien, die aus hitzeharten Pflanzen isoliert worden sind, auch gegenüber einer Thermobehandlung in vitro stabiler sind im Vergleich zu Organellen, welche aus nicht hitzeharten Pflanzen präpariert wurden, vermutlich auf Eigenschaften ihrer Biomembranen zurückzuführen (Andreeva, 1969).

4.2.2. Photosynthese

Während die Atmungsvorgänge in vivo relativ thermostabil sind (Abb. 10,11,14), wird die Photosynthese durch Hitzeeinwirkung in situ stark beeinträchtigt. Dies äußert sich auch in einem Aktivitätsverlust der Thylakoide. Obwohl die absolute Temperatur, bei der die Photosynthese inaktiviert wird, stets gewissen materialabhängigen Schwankungen unterworfen ist, brechen nach einer Hitzebehandlung von Blattmaterial derselben Herkunft die photochemischen Reaktionen der Thylakoide (Abb. 12) nicht bei höheren Temperaturen zusammen als die $CO_2$-Fixierung der Blätter (Abb. 10), sondern nahezu parallel mit dieser. Dies und die Tatsache, daß auch die Einwirkung überoptimaler Temperaturen auf isolierte Protoplasten, bei denen Schließzell- und Gewebebarrieren entfallen, in einer drastischen Inaktivierung der Photosynthese resultiert (Abb. 11), läßt den Schluß zu, daß deren Hitzeempfindlichkeit nicht auf eine mangelnde $CO_2$-Verfügbarkeit zurückzuführen sein dürfte. Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein. Transpirationsmessungen ergaben, daß die Hitzeinaktivierung der $CO_2$-Fixierung ganzer Blätter nicht durch den Verschluß der Stomata hervorgerufen wird (Bauer, 1978). Ferner wird bei einer gegebenen Temperatur die Photosynthese sowohl unter sättigenden als auch unter limitierenden $CO_2$-Bedingungen im selben Ausmaß gehemmt (Ref. bei Berry und Björkman, 1980). Somit dürfte es unwahrscheinlich sein, daß die Inhibierung durch eine Erhöhung des Transportwiderstandes zwischen Interzellularen und Chloroplasten hervorgerufen werden könnte. Vielmehr sprechen obige Befunde dafür, daß die Inaktivierung der Photosynthese durch Einwirkung überoptimaler Temperaturen auf eine erhöhte Hitzeempfindlichkeit des Photosyntheseapparats selbst zurückzuführen ist.

Früheren Untersuchungen zufolge ist die hitzeinduzierte Hemmung der Photosynthese in Blättern eine Konsequenz der limitierten ATP-Produktion der Thylakoide: es ist weniger Energie für die Regeneration des Substrats der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase vorhanden (Badger et al., 1982; Stidham et al., 1982).

Ähnlich wurde auch die Inaktivierung der $CO_2$- und Phosphoglyceratreduktion nach einer Hitzebehandlung intakter isolierter Chloroplasten erklärt (Krause und Santarius, 1975). Ferner weisen die hohe Thermostabilität der Chloroplastenhülle (Krause und Santarius, 1975) sowie zumindest einiger löslicher Enzyme des Calvin-Zyklus (Santarius, 1975; Krause und Santarius, 1975; Berry und Björkman, 1980) darauf hin, daß die Thylakoidmembran der primäre Schädigungsort innerhalb des photosynthetischen Apparats ist.

Eine drastische Beeinträchtigung der energiekonservierenden Reaktionen der Thylakoide tritt unabhängig davon ein, ob die Hitzebehandlung in situ (Abb. 12) oder in vitro (Abb. 13) stattgefunden hat (vgl. Santarius, 1980). Da die chemische Umgebung die Thermosensitivität der Thylakoide entscheidend beeinflußt (Santarius, 1973; Krause und Santarius, 1975; Weis, 1982a), kann ein bestimmtes Schadensausmaß nach Erhitzen in situ bzw. in vitro durchaus bei verschiedenen Temperaturen eintreten. Das Inaktivierungsmuster, welches die energiekonservierenden Reaktionen aufweisen, ist jedoch in beiden Fällen das gleiche (Abb. 12+13). Die nichtzyklische Photophosphorylierung wird stärker gehemmt als der gekoppelte Elektronentransport, was mit früheren Untersuchungen übereinstimmt (Santarius, 1975; Badger et al., 1982; Stidham et al., 1982). Folglich werden die ADP/O-Werte gesenkt, d.h. es tritt eine Entkopplung ein. Eine Stimulation des Elektronentransports bei gleichzeitiger Inaktivierung der Photophosphorylierung, welche z.B. nach einer Gefrierbehandlung isolierter Thylakoide erfolgt (Tab. I, Abb. 1,2,4), läßt sich jedoch nach Einwirkung von Hitze nicht beobachten. Vielmehr erfahren sowohl der gekoppelte als auch der basale und entkoppelte Elektronentransport eine deutliche Hemmung (Santarius, 1975; Stidham et al., 1982).

Als empfindlichste Stelle des ET erwies sich die Wasserspaltungsreaktion im Photosystem II (Santarius, 1975; weitere Referenzen bei Berry und Björkman, 1980 und Weis, 1982b). Der hitzeinduzierte Zusammenbruch des lichtgetriebenen Membranpotentials

(Santarius und Müller, 1979) noch bei tieferen Temperaturen im Vergleich zur Wasserspaltung (Weis, 1982b) sowie der Anstieg der lichtinduzierten Chlorophyllfluoreszenz (Krause und Santarius, 1975; Berry et al., 1975) weisen hingegen darauf hin, daß die Hemmung des Elektronentransports und die Entkopplung der Photophosphorylierung lediglich Symptome einer unmittelbareren hitzeinduzierten Veränderung der Thylakoidmembranstruktur darstellen könnten. Welcher Art diese Veränderungen sind, ist noch nicht genau geklärt. Untersuchungen von Santarius (1980) deuten darauf hin, daß die Hitzeschädigung von Thylakoiden möglicherweise nicht durch eine chemische Veränderung der Membranlipide verursacht wird. Ebensowenig dürfte die hitzeinduzierte Photosynthesehemmung in Blättern auf Veränderungen in den Strukturproteinen der Thylakoide zurückzuführen sein (Yordanov et al., 1975). Dagegen führt eine Hitzebehandlung sowohl in vivo als auch in vitro (Armond et al., 1980; Volger und Santarius, 1981) zu einer Proteinablösung von den Thylakoiden, welche nahezu simultan mit der Inaktivierung photochemischer Reaktionen einhergeht (Volger und Santarius, 1981). Ob diese ursächlich auf die Abdissoziation von Membranproteinen zurückgeführt werden kann, ist fraglich, da zum einen nur eine geringe Proteinmenge freigesetzt wird und zum andern die hitzeinduzierte Reduktion der Protonenaufnahme möglicherweise nicht durch eine Dissoziation des Kopplungsfaktors $CF_1$ hervorgerufen wird (Stidham et al., 1982).

Nach einer Hitzebehandlung in situ tritt eine Proteinfreisetzung aus Blättern bei nahezu denselben Temperaturen ein, die zu einer irreversiblen Inaktivierung der Photosynthese führen (Björkman et al., 1980; Badger et al., 1982). Es ist jedoch noch offen, ob dieser Verlust auch diejenigen Stromaenzyme umfaßt, welche im Gegensatz zur hohen Hitzestabilität der meisten löslichen Enzyme des Calvinzyklus (Ref. siehe oben) eine deutliche Thermosensitivität aufweisen. Die Inaktivierung dieser lichtaktivierten Stromaenzyme setzt zwar bei denselben Temperaturen ein, die eine irreversible Inhibierung der Photosynthese verursachen, ist aber vermutlich auf eine hitzeinduzierte Hemmung der Pho-

tosystem II - Aktivität und damit letztlich auf eine Schädigung der Thylakoide zurückzuführen (Berry und Björkman, 1980). Ähnliches gilt auch für die bei milder Hitzebehandlung eintretende Inhibierung der Lichtaktivierung der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (Weis, 1981b), eines an sich sehr thermostabilen Enzyms (Bauer und Senser, 1979; Björkman et al., 1976). Deren Hemmung, die nach Weis (1981a) für die reversible Inaktivierung der $CO_2$-Fixierung nach milder Hitzebehandlung von Spinatblättern verantwortlich ist, dürfte durch eine Leitfähigkeitsänderung der Thylakoidmembran für ladungskompensierende Ionen hervorgerufen werden (Weis, 1981c; vgl. Weis, 1982a).

### 4.2.3. Kompartimentierung

Veränderungen im Stromamilieu, die die Aktivität der Enzyme des Calvin-Zyklus und membrangebundener Reaktionen beeinflussen können (Ref. bei Enser, 1980), könnten nicht nur durch Ionenverschiebungen über die Thylakoidmembran, sondern durch veränderte Eigenschaften des Envelope hervorgerufen werden. Nach Bauer und Senser (1979) treten parallel zur völligen (reversiblen) Hemmung der Photosynthese hitzebehandelter Blätter nach Einwirkung von Temperaturen, welche die Hill-Reaktion der aus diesen Blättern isolierten Thylakoide nur zu zwei Dritteln inaktivieren, elektronenmikroskopisch sichtbare (reversible) Ultrastrukturveränderungen der Chloroplastenhüllmembran ein, welche eine Störung der Kompartimentierung der Stromaenzyme zur Folge haben könnten. Erhitzen isolierter Chloroplasten führt jedoch nicht zu einer vermehrten unspezifischen Permeation ionischer Substanzen durch den Envelope, welcher sich somit in vitro als relativ hitzestabil erwies (Krause und Santarius, 1975). Klare Hinweise auf eine hitzeinduzierte Permeabilitätserhöhung der Chloroplastenhüllmembran gibt es somit nicht.

Nun ist eine Schädigung des Envelope keine zwingende Voraussetzung für die Änderung des Ionenmilieus im Stroma, da z.B. pH-Verschiebungen außerhalb der Chloroplasten durch indirekten

$H^+$-Transport über die intakte Chloroplastenhülle auf das Stroma übertragen werden (Heber et al., 1974; Enser und Heber, 1980). Dessen Ansäuerung, die zu einer Hemmung der Photosynthese führt (Enser und Heber, 1980), könnte somit auch durch eine hitzeinduzierte Permeabilitätserhöhung anderer zellulärer Biomembranen, speziell des Tonoplasten, hervorgerufen werden, woraus eine Überflutung des Cytoplasmas mit sauren Vakuoleninhaltsstoffen resultiert. Ein drastischer Semipermeabilitätsverlust von Tonoplast und Plasmalemma tritt jedoch erst nach der Einwirkung von Temperaturen ein, welche diejenigen, die eine völlige Inaktivierung der Photosynthese bewirken, um mehr als 10°C überschreiten (Abb. 14+15; Tab. III). Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein (Berry et al., 1975; Björkman et al., 1980; Badger et al., 1982; Weigel, 1983) und legt die Schlußfolgerung nahe, daß die Hitzeinaktivierung der Photosynthese nicht primär auf einen generellen Zusammenbruch der Zellkompartimentierung zurückzuführen sein dürfte.

Die Möglichkeit, daß auch geringfügige Ionenleckflüsse aus der Vakuole über den oben erwähnten Mechanismus zu Änderungen des Ionenmilieus im Stroma und damit zur Hemmung der Photosynthese führen können, ist jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen. Tatsächlich erfolgt ein in Relation zum Gesamtionengehalt unbedeutender Austritt von Ladungsträgern aus erhitzten isolierten Protoplasten auch in dem Temperaturbereich (40-50°C), in dem die graduelle Schädigung der Photosynthese abläuft (vgl. Abb. 11+14 mit Abb. 15 + Tab. III). Nun muß dieser Ionenefflux, der denjenigen der nichterhitzten Kontrollen um weniger als 10 % übersteigt (vgl. 3.2.3. S. 56), jedoch nicht unbedingt auf einen Leckfluß aus der Vakuole zurückzuführen sein. Vielmehr sind zwei Möglichkeiten denkbar, zwischen denen nicht differenziert werden kann.

1.) Der Tonoplast ist hitzeempfindlicher als das Plasmalemma. Dann flössen weit mehr Vakuoleninhaltsstoffe ins Cytoplasma, als z.B. auf dem Weg der passiven Permeation (siehe unten) die Protoplasten verlassen könnten; d.h. eine Schädigung

des Tonoplasten erfolgte bereits nach milder Hitzebehandlung. Untersuchungen von Weigel (1983) zufolge unterscheiden sich jedoch Vakuolen, die aus Blättern oder Protoplasten nach einer Inkubation bei 45°C bzw. bei 20°C isoliert worden sind, weder hinsichtlich ihres $K^+$-Gehalts noch bezüglich des Protonengradienten über den Tonoplasten. Sowohl in vitro erhitzte als auch aus hitzebehandelten Blättern bzw. Protoplasten isolierte Vakuolen weisen eine Schädigung des Tonoplasten erst bei Temperaturen oberhalb von 45°C auf. Anhand von Messungen der 9-Aminoacridin-Fluoreszenzlöschung hitzebehandelter Protoplasten, welche Aussagen über die Intaktheit des Tonoplasten in situ, d.h. in dessen natürlicher Umgebung ermöglichen, ergeben sich signifikante Hitzeschädigungen der Vakuolen erst oberhalb von 55°C. Dies stimmt mit den vorliegenden Meßergebnissen überein (Abb. 14+15; Tab. III).

2.) Ein Ionenefflux erfolgt zunächst nur aus dem Cytoplasma durch das Plasmalemma, ohne daß Substanzen aus der Vakuole austräten. Ein passiver Leckfluß gelöster Substanzen könnte nicht nur während der Protoplastenisolierung (Taylor und Hall, 1976; vgl. 3.2.1. S. 46), sondern auch durch das Plasmalemma isolierter Protoplasten eintreten, welche in einem relativ ionenarmen Medium (2.6.2.3. S. 13) suspendiert sind. Es ist wahrscheinlich, daß diese Permeation entlang dem Konzentrationsgradienten bei ansteigender Temperatur, welche unter anderem auch eine erhöhte Membranflexibilität zur Folge hat, in vermehrtem Ausmaß einsetzen kann.

### 4.2.4. Mögliche Ursachen irreversiblen Hitzeschadens bei Pflanzen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen in Zusammenhang mit früheren Untersuchungen den Schluß zu, daß verschiedene Biomembranen der Blattzelle beträchtliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Hitzestabilität aufweisen, wobei die Thylakoidmembran einer der hitzeempfindlichsten Orte und die Photosynthese einer der hitzeempfindlichsten Prozesse sein dürfte.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die hier beobachtete Inaktivierung der Photosynthese die primäre Ursache einer irreversiblen Hitzeschädigung des Blattgewebes darstellt. Ihre nach einer milden Hitzeeinwirkung auftretende Hemmung kann nach Rückführung der behandelten Blätter zu gemäßigten Temperaturen vollkommen reversibel sein, wobei die Dauer dieser Erholung von Intensität und Dauer der vorhergehenden Erhitzung abhängig ist (Yordanov et al., 1975; Weis, 1981a,c). So ist nicht ganz auszuschließen, daß nach der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten mindestens 90 minütigen Aufbewahrung der Blätter bei Zimmertemperatur die Erholung der Photosynthese noch nicht völlig abgeschlossen war (Abb. 10). Die Blätter wiesen in diesem Zustand keinen sichtbaren Gewebeschaden auf. Dieser tritt erst nach mehreren Tagen bis zu einer Woche im Anschluß an die Hitzebehandlung einzelner Blätter bei weit höheren Temperaturen (3 min bei 47-52°C) ein, wobei das Absterben der Blätter umso eher erfolgt, je höher die Behandlungstemperatur war (Santarius, unveröffentlicht). Selbst nach stärkerer Hitzeeinwirkung auf an der Pflanze belassene Blätter ist die Hemmung der Photosynthese noch vollkommen reversibel, wenn auch die Erholung mehrere Wochen bis Monate erfordern kann. Sie ist jedoch nicht mehr möglich, nachdem bereits nekrotische Veränderungen im Blattgewebe eingetreten sind (Bauer et al., 1969; Bauer, 1972; 1978). Daß diese primär durch eine vorhergehende irreversible Schädigung des Photosyntheseapparats hervorgerufen werden, erscheint zwar möglich, ist aber nicht bewiesen.

Das hitzeinduzierte Absterben anderer Pflanzenteile als der Blätter dürfte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf andere Ursachen als eine Inaktivierung der Photosynthese zurückzuführen sein. So ist es denkbar, daß z.B. Wurzeln, die eine im Vergleich zum oberirdischen Sproß höhere Thermosensitivität aufweisen (Larcher, 1980), durch eine Inaktivierung der Atmung geschädigt werden könnten, die sich in Blattzellen als ein relativ hitzestabiler Prozeß erwies (Abb. 10-12,14). Ebensowenig muß der Hitzetod bestimmter Organe notwendigerweise ein Absterben des gesamten Organismus bewirken; ein Absterben ausgewachsener Blätter kann z.B. toleriert werden, sofern die Erneuerungsknospen keinen Schaden erlitten haben (Larcher, 1980). Die Ursache des Hitzetods der Pflanze dürfte somit nicht in der Beeinträchtigung eines einzelnen Faktors zu suchen sein. Eher kommt der Hitzeschaden durch eine Vielzahl struktureller und funktioneller Abweichungen zustande, die je nach Intensität und Dauer des Hitzestresses verschiedener Natur sein können (Larcher, 1973; Levitt, 1980). Eine Langzeiteinwirkung von Temperaturen gerade oberhalb des Wachstumsoptimums kann verschiedene Stoffwechselstörungen zur Folge haben, welche langfristig ein Absterben des Organismus bewirken können. Dazu gehören Produktionseinbußen sowie letztlich das Verhungern durch Verbrauch der Kohlenhydratreserven, welcher auf die höhere Hitzeempfindlichkeit der Photosynthese im Vergleich zur Atmung zurückzuführen ist. In diesem Fall verursacht die Inaktivierung der Photosynthese zumindest indirekt den Hitzetod der Pflanze. Die im Rahmen dieser Arbeit nach kurzfristigen Hitzebehandlungen beobachteten Schädigungen dürften allerdings nicht auf Verhungern zurückzuführen sein. Eine kurzzeitige Einwirkung extrem hoher Temperaturen hingegen kann ein direktes Absterben der Zelle zur Folge haben, welches durch Hitzekoagulation der Proteine oder einen Zusammenbruch der Zellkompartimentierung, der auf Membranzerstörung zurückzuführen ist, verursacht werden kann (vgl. Levitt, 1980). Letzteres dürfte bei der hier beobachteten drastischen Erhöhung des Ioneneffluxes bzw. der Veränderung der Anfärbbarkeit der Protoplasten durch Neutralrot und Evan's Blau der Fall sein (Abb. 14+15; Tab. III).

## 4.3. Vergleich der Wirkung von Gefrieren und Hitze

Es konnte beobachtet werden, daß bei vielen Pflanzen die im Herbst einsetzende Frosthärtung von einem Anstieg der Trocken- und Hitzeresistenz begleitet ist (Ref. bei Santarius, 1973 und Levitt, 1980). Da die Frosthärtung mit einer Akkumulation von Schutzstoffen wie Zuckern verbunden ist (Ref. bei Levitt, 1980), welche isolierte Thylakoide nicht nur gegen Gefrierschädigung, sondern auch vor einer Inaktivierung durch Hitze und Austrocknung bewahren können (Santarius, 1973), liegt es nahe zu vermuten, daß der oft parallelen Entwicklung der Frost-, Hitze- und Trockenresistenz im Winter die gleichen molekularen Mechanismen zugrunde liegen könnten. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, daß sowohl eine Hitzehärtung (Sapper, 1935 zitiert aus Levitt, 1980) als auch Frost- und Austrocknungsresistenz (Cloutier und Siminovitch, 1982; Siminovitch und Cloutier, 1982) durch vorhergehenden Trockenstreß induziert werden können. Dabei scheint die Erhöhung der Resistenz des Protoplasmas gegenüber Trockenheit und extremen Temperaturen auf die während der Härtung erfolgende Dehydratation der Zelle zurückzuführen zu sein. Diese ist, was die Frostresistenz anbetrifft, mit einer Vermehrung des Protoplasma- und Membranmaterials verbunden (Cloutier und Siminovitch, 1982; Siminovitch und Cloutier, 1982), welche bei der Hitzehärtung hingegen noch nicht beobachtet wurde. Ferner zeigen viele Pflanzen im Sommer, wenn die Frosthärte ein Minimum aufweist, einen Anstieg der Hitzeresistenz. Dieser muß folglich auf andere Mechanismen zurückzuführen sein als die oben erwähnte im Winter beobachtete erhöhte Hitzestabilität. Somit liegt es nahe zu vermuten, daß auch Frost- und Hitzeschäden an Pflanzen möglicherweise nicht identisch sind. Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Zwar erweisen sich in Übereinstimmung mit früheren Resultaten Biomembranen als besonders frost- und hitzeempfindliche Orte der Pflanzenzelle, jedoch unterscheiden sich verschiedene Membranen in ihrer Stabilität gegenüber extremen Temperaturen. Ferner ist die Schadensmanifestation nach Frost und Hitze bzw.

nach Einwirkung dieser Temperaturen in vitro und in situ eine unterschiedliche. Isolierte Thylakoide und Mitochondrien werden durch eine Gefrierbehandlung in vitro unter identischen Bedingungen auf unterschiedliche Weise inaktiviert. Dabei erfahren die photosynthetischen Membranen im Gegensatz zu solchen, die aus frostgeschädigten Blättern isoliert worden sind, eine entkopplungsbedingte Stimulation des Elektronentransports und weisen eine höhere Frostempfindlichkeit im Vergleich zu den Mitochondrien auf (Tab. I, Abb. 1). Nach Frosteinwirkung in situ hingegen werden beide Membransysteme im selben Temperaturbereich geschädigt und zeigen das gleiche Inaktivierungsmuster, das primär auf eine Hemmung des Elektronentransports zurückzuführen sein dürfte (Abb. 9). Beim Erhitzen sind die Verhältnisse umgekehrt. Eine Hitzebehandlung in vitro inaktiviert isolierte Thylakoide und Mitochondrien bei nahezu denselben Temperaturen und ruft in ihnen ein ähnliches Schadensmuster hervor (Abb. 13). Im Gegensatz dazu wird die Atmungsaktivität der Mitochondrien nach Erhitzen ganzer Blätter nicht gesenkt, sondern sogar stimuliert (Abb. 12). Die Ergebnisse zeigen in Verbindung mit früheren Resultaten, daß Untersuchungen an in vitro-temperaturbehandelten isolierten Membransystemen zwar notwendig sein können, um nähere Informationen über den Schadensmechanismus zu erhalten, aber keineswegs immer die Verhältnisse nach Einwirkung extremer Temperaturen in situ wiedergeben.

Während Hitze nicht primär zu einer Aufhebung der Zellkompartimentierung führt (Abb. 14+15, Tab. III), ist nicht völlig auszuschließen, daß diese eventuell eine Ursache der simultanen Inaktivierung von Thylakoiden und Mitochondrien nach Gefrieren in situ (Abb. 9) darstellen könnte. Letztere dürfte mit hoher Wahrscheinlichkeit ein irreversibler Schaden sein. Dafür spricht die Tatsache, daß eine Erholung gefrierbehandelter isolierter Blätter nicht beobachtet werden kann, selbst wenn das Gewebe unmittelbar nach dem Gefrieren keinen anhand von Infiltrationsstellen sichtbaren Schaden aufweist (Klosson, 1978). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Inaktivierungen von Thylakoiden nach Hitzeeinwirkung in vivo könnten hingegen möglicherweise reversibler Natur sein (vgl. 4.2.4. S. 78).

Die unterschiedliche Schädigung verschiedener Biomembranen der Pflanzenzelle durch Hitze bzw. Frost könnte evtl. damit zusammenhängen, daß beim Gefrieren im Gegensatz zu einer Hitzeeinwirkung noch eine Reihe anderer Streßfaktoren hinzukommen. Dies sind Wasserstreß (Dehydratisierung der Zelle während der extrazellulären Eisbildung, Rehydratisierung beim Tauen) und damit verbundener mechanischer Streß, welcher auf die Membranen einwirkt (Kontraktion während des Gefrierens, Expansion während des Tauens) sowie eine mögliche Erhöhung der Toxizität des Zellmilieus durch Konzentrierung von Substanzen in der ungefrorenen Restlösung.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen extremer Temperaturen auf verschiedene Biomembranen von Blattzellen untersucht, um aus der relativen Empfindlichkeit dieser Membranen nähere Informationen über die Natur des Frost- und Hitzeschadens zu erhalten. Dazu wurden anhand des $CO_2$- und $O_2$-Gaswechsels Atmungs- und Photosyntheseaktivität frost- und hitzebehandelter Blätter und Protoplasten von Spinat (Spinacia oleracea L.) und Feldsalat (Valerianella locusta (L.) Betcke) gemessen. Weiterhin wurden der Elektronentransport, dessen photosynthetische bzw. respiratorische Kontrolle sowie die Phosphorylierung isolierter Mitochondrien und Thylakoide nach einer Temperaturbehandlung in vitro bzw. in situ registriert. An isolierten temperaturbehandelten Protoplasten wurden Untersuchungen zur Permeabilität von Tonoplast und Plasmalemma durchgeführt.

Mitochondrien und Thylakoide, welche in einem speziell entwikkelten Präparationsgang aus demselben Blattmaterial isoliert und in identischen Medien mit 200 mM NaCl als Osmotikum einer zwei- bis vierstündigen Gefrierbehandlung in vitro bei -20 bis -25°C unterzogen worden sind, unterscheiden sich stark hinsichtlich ihres Inaktivierungsmusters. In Abwesenheit von Frostschutzstoffen tritt bei Thylakoiden eine vollständige Entkopplung der Photophosphorylierung vom Elektronentransport ein, welcher im Vergleich zu den ungefrorenen Kontrollen um das 3- bis 6-fache stimuliert wird. Bei Mitochondrien hingegen erfolgt eine Hemmung sowohl des Elektronentransports als auch der ATP-Synthese. Letztere wird etwas stärker inaktiviert, so daß die ADP/O-Werte ebenfalls absinken. Gleichzeitig wird die respiratorische Kontrolle erniedrigt. Die Tatsache, daß unter identischen Gefrierbedingungen Thylakoide höhere Saccharose-Konzentrationen benötigen, um ein Ausmaß an Schutz zu erreichen, welches dem aus demselben Blattmaterial stammenden Mitochondrien vergleichbar ist,

demonstriert ihre höhere Empfindlichkeit gegenüber Gefrieren in vitro. Die Einwirkung hoher Salzkonzentrationen (0,6 - 2 M NaCl) bei 0°C beeinflußt den Elektronentransport beider Biomembransysteme in ähnlicher Weise wie eine Gefrierbehandlung in vitro. Somit dürfte die Hemmung des Elektronentransports bei Mitochondrien und dessen Stimulierung bei Thylakoiden nach Gefrieren in Anwesenheit von Salzen im wesentlichen durch deren Konzentrationsanstieg in der ungefrorenen Restlösung verursacht werden. Im Gegensatz zu den Membranen, welche einer Gefrierbehandlung in vitro unterzogen worden sind, weisen aus gefrorenen (2 h Verweildauer bei Minimumtemperaturen von -5 bis -9°C) und aufgetauten Blättern isolierte Mitochondrien und Thylakoide dasselbe Inaktivierungsmuster auf, das dem der Mitochondrien nach Gefrieren in vitro ähnelt und primär auf eine Hemmung des Elektronentransports zurückzuführen sein dürfte. Eine Stimulation des Elektronentransports tritt nach Gefrieren in situ nicht ein. Beide Biomembransysteme werden simultan innerhalb eines engen Temperaturbereichs von -5 bis -7°C inaktiviert.

Eine kurzfristige Hitzebehandlung intakter Blätter (6 min bei 38 bis 42°C) und isolierter Protoplasten (3 min bei 38 bis 47°C) führt zur Inaktivierung der Netto-Photosynthese bei Temperaturen zwischen 41 und 44°C, welche die endogene Dunkelatmung kaum beeinflussen. Die größere Hitzeempfindlichkeit der Photosynthese im Vergleich zur Atmung manifestiert sich auch in Thylakoiden und Mitochondrien, welche aus hitzebehandelten Blättern isoliert worden sind. Die Thylakoide erfahren eine Hemmung ihrer photochemischen Reaktionen im selben Temperaturbereich wie die $CO_2$-Fixierung intakter Blätter. Elektronentransport und ATP-Synthese der Mitochondrien hingegen werden im Vergleich zu den Kontrollen leicht stimuliert. Aus ungeschädigten Blättern isolierte, in vitro erhitzte Mitochondrien (3 min bei 30 bis 44°C) werden jedoch im selben Temperaturbereich inaktiviert wie ebenso behandelte Thylakoide. Dies zeigt, daß Mitochondrien durch den Verlust ihrer nativen cytoplasmatischen Umgebung signifikant hitze-

labiler geworden sind. Bei beiden Biomembransystemen erfahren sowohl der Elektronentransport als auch die ATP-Synthese nach Erhitzen in vitro eine Erniedrigung. Eine Hitzebehandlung von Protoplasten, die zu einer völligen Inaktivierung der Photosynthese und zu einer Senkung der Atmungsaktivität auf die Hälfte der Ausgangsrate vor dem Erhitzen führt, beeinträchtigt die Intaktheit von Tonoplast und Plasmalemma kaum. Dies ist aus der Fähigkeit der Protoplasten, Evan's Blau auszuschließen und Neutralrot in ihren Vakuolen zu akkumulieren, ersichtlich. Eine drastische Erhöhung des Ioneneffluxes, die einen Zusammenbruch der Semipermeabilität von Tonoplast und Plasmalemma widerspiegelt, findet erst im Temperaturbereich von 58 bis 61°C statt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß verschiedene Biomembranen der Blattzelle eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber extremen Temperaturen aufweisen. In intakten Blättern und in Protoplasten stellt die Photosynthese einen der thermolabilsten Prozesse dar. Ihre Hitzeinaktivierung dürfte eher auf eine Schädigung der Thylakoidmembran selbst als auf einen Verlust der Zellkompartimentierung zurückzuführen sein. Demgegenüber verursacht Gefrieren in situ einen parallelen Zusammenbruch der energiekonservierenden Reaktionen von Mitochondrien und Thylakoiden, welcher möglicherweise eine Sekundärschädigung darstellen könnte.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Alexandrov, V.Y. (1977): Cells, Molecules and Temperature. Conformational Flexibility of Macromolecules and Ecological Adaptation. Ecological Studies, Vol 21. Springer, Berlin

Anderson, J.O., McDaniel, R.G. (1978): Mitochondrial activity, adenosine triphosphate content, and adenylate energy charge as a measure of plant cell and tissue viability. Cryobiology 15, 700

Andreeva, I.N. (1969): Effect of temperature on the swelling and shrinkage of isolated mitochondria. Soviet Pl. Physiol. 16, 182-187

Armond, P.A., Björkman, O., Staehelin, L.A. (1980): Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. Biochim. Biophys. Acta 601, 433-442

Arnon, D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24, 1-15

Avron, M. (1977): Energy transduction in chloroplasts. Ann. Rev. Biochem. 46, 143-155

Badger, M.R., Björkman, O., Armond, P.A. (1982): An analysis of photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants: temperature acclimation in the desert evergreen Nerium oleander L. Plant, Cell and Environment 5, 85-99

Bauer, H. (1972): $CO_2$-Gaswechsel nach Hitzestress bei Abies alba Mill. und Acer pseudoplatanus L. Photosynthetica 6, 424-434

Bauer, H. (1978): Photosynthesis of ivy leaves (Hedera helix) after heat stress. I. $CO_2$-gas exchange and diffusion resistances.
Physiol. Plant. 44, 400-406

Bauer, H., Huter, M., Larcher, W. (1969): Der Einfluß und die Nachwirkungen von Hitze- und Kältestreß auf den $CO_2$-Gaswechsel von Tanne und Ahorn.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, 65-70

Bauer, H., Larcher, W., Walker, R.B. (1975): Influence of temperature stress on $CO_2$-gas exchange.
In: Photosynthesis and productivity in different environments. International Biological Program, Vol 3, S. 557-586, Cambridge University Press.

Bauer, H., Senser, M. (1979): Photosynthesis of ivy leaves (Hedera helix L.) after heat stress. II. Activity of ribulose bisphosphate carboxylase, Hill reaction, and chloroplast ultrastructure.
Zeitschr. Pflanzenphysiol. 91, 359-369

Berry, J., Björkman, O. (1980): Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 491-543

Berry, J.A., Fork, D.C., Garrison, S. (1975): Mechanistic studies of thermal damage to leaves.
Carnegie Inst. Year Book 74, 751-759

Björkman, O., Badger, M.R., Armond, P.A. (1980): Response and adaptation of photosynthesis to high temperatures.
In: Adaptation of plants to water and high temperature stress. Turner, N.C., Kramer, P.J. (eds), S. 233-249, J. Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto

Björkman, O., Boynton, J., Berry, J. (1976): Comparison of the heat stability of photosynthesis, chloroplast membrane reactions, photosynthetic enzymes, and soluble protein content in leaves of heat-adapted and cold-adapted $C_4$-species.
Carnegie Inst. Year Book 75, 400-407

Chance, B., William, G.R. (1955): Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state.
J. Biol. Chem. 217, 409-427

Cloutier, Y., Siminovitch, D. (1982): Augmentation of protoplasm in drought- and coldhardened winter wheat.
Can. J. Bot. 60, 674-680

Day, D.A., Arron, J.P., Laties, G.G. (1980): Nature and control of respiratory pathways in plants. The interaction of cyanide-resistant respiration with the cyanide-sensitive pathway. In: Biochemistry of Plants, Vol 2, Metabolism and Respiration. Davis, D.D., ed, S. 198-241, Academic Press, New York

Day, D.A., Hanson, J.B. (1977): Effect of phosphate and uncouplers on substrate transport and oxidation by isolated corn mitochondria.
Plant Physiol. 59, 139-144

Dickinson, D.B., Misch, M.J., Drury, R. (1967): Dimethyl sulfoxide protects tightly coupled mitochondria from freezing damage.
Science 156, 1738-1739

Dizengremel, P., Chauveau, M. (1978): Mechanism of temperature action on electron transport in cyanide-sensitive and cyanide-resistant plant mitochondria.
In: Plant Mitochondria. Proceedings of the International Symposium on Plant Mitochondria, Marseille. Ducet, G., Lance, C., eds, S. 267-274, Elsevier/North Holland Biomedical Press

Douce, R., Moore, A.R., Neuberger, M. (1977): Isolation and oxidative properties of intact mitochondria isolated from spinach leaves.
Plant Physiol. 60, 625-628

Edwards, G.E., Robinson, S.P., Taylor, N.J.C., Walker, D.A. (1978): Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast extracts, and chloroplasts of wheat. Influence of orthophosphate, pyrophosphate and adenylates.
Plant Physiol. 62, 313-319

Enser, U. (1980): Die Bedeutung der Chloroplastenhülle für die Steuerung der Photosynthese.
Inauguraldissertation, Universität Düsseldorf

Enser, U., Heber, U. (1980): Metabolic regulation by pH gradients. Inhibition of photosynthesis by indirect proton transfer across the chloroplast envelope.
Biochim. Biophys. Acta 592, 577-591

Estabrook, R.W. (1967): Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O-ratios.
In: Oxidation and Phosphorylation, Estabrook, R.W., Pullman, M.E., eds
Methods Enzymol. X, 41-47

Gaff, D.F., Okong'o-Ogola, O. (1971): The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells.
J. Exp. Bot. 22, 756-758

Gale, J. (1982): Evidence for essential maintenance respiration of leaves of Xanthium strumarium at high temperature.
J. Exp. Bot. 33, 471-476

Garber, M.P., Steponkus, P.L. (1976): Alterations in chloroplast thylakoids during an in vitro freeze-thaw cycle.
Plant Physiol. 57, 673-680

Gazeau, C.-M. (1974): Influence du glycerol sur le maintien des ultrastructures mitochondriales dans les tissues méristematiques des racines de Blé, soumis à des congélations intenses (-196°C).
C.R. Acad. Sci. (Paris) 278, 2429-2432

Gimmler, H., Kühnl, E.M., Carl, G. (1978): Salinity dependent resistance of Dunaliella parva against extreme temperatures. I. Salinity and thermoresistance.
Zeitschr. Pflanzenphysiol. 90, 133-153

Hanson, J.B., Day, D.A. (1980): Plant Mitochondria.
In: Biochemistry of Plants, Vol 1, The Plant Cell.
Tolbert, N.E., ed, S. 315-358, Academic Press, N.Y.

Hartung, W., Gimmler, H., Heilmann, B., Kaiser, G. (1980): The site of abscisic acid metabolism in mesophyll cells of Spinacia oleracea.
Plant Sci. Lett. 18, 359-364

Heber, U. (1967): Freezing injury and uncoupling of phosphorylation from electron transport in chloroplasts.
Plant Physiol. 42, 1343-1350

Heber, U. (1968): Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing.
Cryobiology 5, 188-201

Heber, U., Kirk, M.R., Gimmler, H., Schäfer, G. (1974): Uptake and reduction of glycerate by isolated chloroplasts.
Planta (Berl.) 120, 31-46

Heber, U., Santarius, K.A. (1964): Loss of adenosine triphosphate synthesis caused by freezing and its relationship to frost hardiness problems.
Plant Physiol. 39, 712-719

Heber, U., Santarius, K.A. (1973): Cell death by cold and heat and resistance to extreme temperatures. Mechanisms of hardening and dehardening.
In: Temperature and Life. Precht, H., Christophersen, J., Hensel, H., Larcher, W., eds, S. 232-263, Springer, Berlin - Heidelberg - New York

Heber, U., Santarius, K.A. (1976): Water stress during freezing.
In: Water and Plant Life, Ecological Studies, Vol 19, Lange, O.L., Kappen, L., Schulze, E.D., eds, S. 253-267, Springer, Berlin - Heidelberg - New York

Heber, U., Schmitt, J.M., Krause, G.H., Klosson, R.J., Santarius, K.A. (1981): Freezing damage to thylakoid membranes in vitro and in vivo.
In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Morris, G.J., Clarke, A., eds, S. 263-288, Academic Press, London - New York - Toronto - Sidney - San Francisco

Heber, U., Tyankova, L. Santarius, K.A. (1973): Effects of freezing on biological membranes in vivo and in vitro. Biochim. Biophys. Acta 291, 23-37

Heber, U., Volger, H., Overbeck, V., Santarius, K.A. (1979): Membrane damage and protection during freezing.
In: Advances in Chemistry Series, No 180. Proteins at Low Temperatures, Fennema, O., ed, S. 159-189, American Chemical Society, Washington, D.C.

Hesse, H., Jank-Ludwig, R., Strotmann, H. (1976): On the reconstitution of photophosphorylation in $CF_1$-extracted chloroplasts.
Z. Naturforsch. 31c, 445-451

Izawa, S. (1980): Acceptors and donors for chloroplast electron transport.

b.w.

Lovelock, J.E. (1953): The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochim. Biophys. Acta 11, 28-36

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

Meryman, H.T. (1970): The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury.
In: Ciba Found. Symp. on the Frozen Cells. Wolstenholme, G.E.W., O'Connor, M., eds, S. 51-67, Churchill Ltd., London

Meryman, H.T., Williams, R.J., Douglas, M.St.J. (1977): Freezing injury from "solution effect" and its prevention by natural or artificial cryoprotection.
Cryobiology 14, 287-302

Mitchell, P. (1966): Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.
Biol. Rev. 41, 445-502

Mollenhauer, A., Schmitt, J.M., Coughlan, S., Heber, U. (1983): Loss of membrane proteins from thylakoids during freezing.
Biochim. Biophys. Acta (im Druck)

Nash, D., Paleg, L.G., Wiskich, J.T. (1982): Effect of proline, betaine and other solutes on the heat stability of mitochondrial enzymes.
Austr. J. Plant Physiol. 9, 47-57

Nelson, N. (1980): Coupling factors from higher plants.
In: Photosynthesis and Nitrogen Fixation, Part C, San Pietro, A., ed, S. 301-313, Methods Enzymol. Vol 69, Academic Press, New York - London - Toronto - Sidney - San Francisco

Nezgovorov, L.A. (1978): Estimation of heat injury to leaves from the amount of cell sap pressed out of them. Soviet Plant Physiol. 25, 965-971

Nikulina, G.N. (1969): Relative quantitative evaluation of the energy efficiency of respiration at high temperatures. Bot. Zh. 54, 1242-1253

Palmer, J.M., Møller, I.M. (1982): Regulation of NAD(P)H-dehydrogenases in plant mitochondria. TIBS 7, 258-261

Palta, J.P., Li, P.H. (1978): Cell membrane properties in relation to freezing injury. In: Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. Li, P.H., Sakai, A., eds, S. 93-115

Palta, J.P., Li, P.H. (1980): Alterations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants: Evidence against rupture theory. Physiol. Plant. 50, 169-175

Penefsky, H.S., Warner, R.C. (1965): Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. VI. Studies on the mechanism of cold inactivation of mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 240, 4694-4702

Petrenko, A.Y., Belous, A.M., Lemeshko, V.V. (1982): The effect of freezing and thawing rates on the functional state and ionic permeability of rat liver mitochondria. Cryo-Lett. 3, 136-147

Robinson, S.P., Wiskich, J.T. (1976): Factors affecting the ADP/O-ratio in isolated chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 440, 131-146

Romani, R., Yu, I. (1968): Mitochondrial resistance to massive irradiation in vivo. V. Repair and the repair overshoot. Arch. Biochem. Biophys. 127, 283-287

Ruesink, A. (1980): Protoplasts of plant cells. In: Photosynthesis and Nitrogen Fixation, Part C. San Pietro, A., ed, S. 69-84, Methods Enzymol. Vol 69, Academic Press, New York - London - Toronto - Sidney - San Francisco

Sagatov, Z.S., Yudina, O.S., Zholkevich, V.N. (1980): Influence of high temperature on respiratory gas exchange and coupling of oxidation with phosphorylation in Pisum sativum. Soviet Plant Physiol. 27, 180-187

Santarius, K.A. (1969): Der Einfluß von Elektrolyten auf Chloroplasten beim Gefrieren und Trocknen. Planta (Berl.) 89, 23-46

Santarius, K.A. (1973): The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. Planta (Berl.) 113, 105-114

Santarius, K.A. (1975): Sites of heat sensitivity in chloroplasts and differential inactivation of cyclic and non-cyclic photophosphorylation by heating. J. Thermal Biol. 1, 101-107

Santarius, K.A. (1980): Membrane lipids in heat injury of spinach chloroplasts. Physiol. Plant 49, 1-6

Santarius, K.A., Giersch, C. (1983): Inactivation and protection of isolated thylakoid membranes during freezing. In: Effects of Stress on Photosynthesis. Marcelle, R., Clijsters, H., van Poucke, M., eds, S. 201-210, Martinus Nijhoff, Dr. W. Junk Publishers, The Hague - Boston - London

Santarius, K.A., Heber, U. (1970): The kinetics of the inactivation of thylakoid membranes by freezing and high concentrations of electrolytes.
Cryobiology 7, 71-78

Santarius, K.A., Müller, M. (1979): Investigations on heat resistance of spinach leaves.
Planta 146, 529-538

Semichatova, O.A., Bushuyeva, T.M., Nikulina, G.N. (1967): The effect of temperature on respiration and oxidative phosphorylation of pea seedlings.
In: The Cell and Environmental Temperature. Troshin, A.S., ed, S. 283-287, Proc. Internat. Symp. Cytoecology, Leningrad 1963. Oxford, Pergamon Press

Senser, M., Beck, E. (1977): On the mechanism of frost injury and frost hardening of spruce chloroplasts.
Planta 137, 195-201

Shavit, N. (1980): Energy transduction in chloroplasts: structure and function of the ATPase complex.
Ann. Rev. Biochem. 49, 111-138

Siggel, U. (1975): The control of electron transport by two pH-sensitive sites.
In: Proc. 3rd Internat. Congr. on Photosynthesis, Vol I. Avron, M., ed, S. 645-654, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam - Oxford - New York

Silva-Lima, M., Peter, H.W. (1980): Effects of $Mg^{2+}$, $Na^{+}$ and $K^{+}$ on the $F_1$-ATPase of mitochondria of Vigna sinensis (L.) Cv. Sêrido.
Int. J. Biochem. 11, 401-405

Siminovitch, D., Cloutier, Y. (1982): Twenty-four-hour induction of freezing and drought tolerance in plumules of winter rye seedlings by desiccation stress at room temperature in the dark.
Plant Physiol. 69, 250-255

Singh, J, (1979): Ultrastructural alterations in cells of hardened and nonhardened winter rye cells during hyperosmotic and extracellular freezing stresses.
Protoplasma 98, 329-342

Singh, J., de la Roche, A.I., Siminovitch, D. (1977): Relative insensitivity of mitochondria in hardened and nonhardened rye coleoptile cells to freezing in situ.
Plant Physiol. 60, 713-715

Steponkus, P.L. (1981): Responses to extreme temperatures. Cellular and subcellular bases.
In: Physiological Plant Ecology I. Responses to the Physical Environment. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H., eds, S. 371-402. Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol 12 A, Springer, Berlin - Heidelberg - New York

Stidham, M.A., Uribe, E.G., Williams III, G.J. (1982): Temperature dependence of photosynthesis in Agropyron smithii Rydb. II. Contribution from electron transport and photophosphorylation.
Plant Physiol. 69, 929-934

Stout, D.G., Majak, W., Reaney, M. (1980): In vivo detection of membrane injury at freezing temperatures.
Plant Physiol. 66, 74-77

Strotmann, H., Hesse, H., Edelmann. K. (1973): Quantitative determination of coupling factor $CF_1$ of chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 314, 202-210

Strotmann, H., Schumann, J. (1983): Structure, function and regulation of chloroplast ATPase.
Physiol. Plant. 57, 375-382

Taylor, A.R.D., Hall, J.L. (1976): Some physiological properties of protoplasts isolated from maize and tobacco tissues.
J. Exp. Bot. 27, 383-391

Thebud, R. (1979): Untersuchungen über die Wirkung des Gefrierens auf pflanzliche Mitochondrien.
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

Thebud, R., Santarius, K.A. (1981): Effects of freezing on isolated plant mitochondria.
Planta 152, 242-247

Trebst, A. (1972): Measurement of Hill reactions and photoreduction.
In: Photosynthesis and Nitrogen Fixation Part B, San Pietro, A., ed, S. 146-165, Methods Enzymol. 24, Academic Press, New York - London - Toronto - Sidney - San Francisco

Ullrich, H., Heber, U. (1961): Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. IV. Das Verhalten von Fermenten und Fermentsystemen gegenüber tiefen Temperaturen.
Planta 57, 370-390

Volger, H., Heber, U., Berzborn, R.J. (1978): Loss of fuction of biomembranes and solubilization of membrane proteins during freezing.
Biochim. Biophys. Acta 511, 455-469

Volger, H., Santarius, K.A. (1981): Release of membrane proteins in relation to heat injury of spinach chloroplasts.
Physiol. Plant. 51, 195-200

Walk, R.A., Michaeli, S., Hock, B. (1977): Glyoxosomal and mitochondrial malate dehydrogenase of watermelon (Citrullus vulgaris) cotyledons. I. Molecular properties of the purified isoenzymes.
Planta 136, 211-220

Weigel, H.J. (1983): The effect of high temperatures on leaf cells: relative heat stability of the tonoplast membrane of mesophyll vacuoles.
Planta (im Druck)

Weis, E. (1981a): Reversible heat-inactivation of the Calvin cycle: a possible mechanism of the temperature regulation of photosynthesis.
Planta 151, 33-39

Weis, E. (1981b): The temperature sensitivity of dark-inactivation and light-activation of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in spinach chloroplasts.
FEBS Lett. 129, 197-200

Weis, E. (1981c): Reversible effects of high, sublethal temperatures on light-induced scattering changes and electrochromic pigment absorption shift in spinach leaves.
Zeitschr. Pflanzenphysiol. 101, 169-178

Weis, E. (1982a): The influence of metal cations and pH on the heat sensitivity of photosynthetic oxygen evolution and chlorophyll fluorescence in spinach chloroplasts.
Planta 154, 41-47

Weis, E. (1982b): The influence of light on the heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in isolated spinach chloroplasts.
Plant Physiol. 70, 1530-1534

Wiest, S.C., Steponkus, P.L. (1978): Freeze-thaw injury to isolated spinach protoplasts and its simulation at above freezing temperatures.
Plant Physiol. 62, 699-705

Williams, R.J., Hope, H.J. (1981): The relationship between cell injury and osmotic volume reduction. III. Freezing injury and frost resistance in winter wheat.
Cryobiology 18, 133-145

Williams, R.J., Shaw, S.K. (1980): The relationship between cell injury and osmotic volume reduction. II. Red cell lysis correlates with cell volume rather than intracellular salt concentration.
Cryobiology 17, 530-539

Williams, R.J., Willemot, C., Hope, H.J. (1981): The relationship between cell injury and osmotic volume reduction. IV. The behaviour of hardy wheat membrane lipids in monolayer.
Cryobiology 18, 146-154

Williams, R.T., Meryman, H.T. (1970): Freezing injury and resistance in spinach chloroplast grana.
Plant Physiol. 45, 752-755

Wiskich, J.T. (1980): Control of the Krebs cycle.
In: The Biochemistry of Plants, Vol 2, Metabolism and Respiration. Davis, D.D., ed, S. 243-278, Academic Press, New York

Yordanov, I., Zeilanov, Y., Stamenova, M. (1975): Influence of postaction of high temperatures on photosynthetic activity. Composition of lamellar proteins and spectral characteristics of pigment systems I and II.
Biochem. Physiol. Pfl. 168, 567-573

Ziegler, P., Kandler, O. (1980): Tonoplast stability as a critical factor in frost injury and hardening of spruce (Picea abies L. Karst.) needles.
Zeitschr. Pflanzenphysiol. 99, 393-410

Herrn Prof. Dr. K.A. Santarius möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die Überlassung des Themas, viele Anregungen und hilfreiche kritische Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. H. Strotmann danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. G.H. Krause, Herrn Priv.-Doz. Dr. Ch. Giersch, Herrn Dr. J. Schumann, Herrn Dr. H.J. Weigel, Herrn Dr. E. Weis und Herrn Dr. R.J. Klosson für viele anregende Diskussionen und wertvolle Hinweise.

## L E B E N S L A U F

| | | |
|---|---|---|
| Name: | Regina Thebud-Lassak | |
| Geburtstag: | 15.11.1954 | |
| Geburtsort: | Düsseldorf | |
| Eltern: | Anton Thebud, Kaufmann, verstorben | |
| | Cäcilie Thebud geb. Reiß | |
| Familienstand: | verheiratet mit Dr. Hans-Friedel Lassak | |
| Schule: | 1961 - 1966 | Volksschule in Düsseldorf |
| | 1966 - 1973 | Städtisches Helene-Lange-Gymnasium, Düsseldorf - Abitur |
| Hochschulstudium: | WS 1973/74 - SS 1979 | Biologie an der Universität Düsseldorf |
| | 1975 | Vordiplom - gut |
| | 1979 | Diplom - sehr gut |
| | 1975 - 1979 | Förderung meines Studiums durch ein Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes |
| Dissertation: | seit 1980 | am Botanischen Institut der Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K.A. Santarius |
| praktische Tätigkeiten: | 1974 - 1983 | studentische bzw. wissenschaftliche Hilfskraft, Universität Düsseldorf (mit Unterbrechungen) |
| | 1979 - 1980 | wissenschaftliche Angestellte, Universität Essen |
| | 2-3/1979 | nebenberufliche Lehrtätigkeit, Aufbaugymnasium Am Bonneshof, Düsseldorf |
| | seit 1977 | nebenberufliche Dozentin an den Volkshochschulen Düsseldorf und (seit 1982) Ratingen |
| | 1977 - 1981 | Mitarbeit an der Pflanzenkartierung Mitteleuropas |